FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

N° 5

Contribution à la biochimie de la glucosamine et à l'étude des glucides combinés du sang

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Le 1943

PAR

Josette MARQUET

ANCIEN PRÉPARATEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE A LA FACULTÉ DE
MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Examinateurs de la Thèse : MM. J. ROCHE, Professeur, *Président.*
MORIN, Professeur.
DUBOULOZ, Professeur
DERRIEN, Chargé de fonct. d'agrégé. — *Assesseurs*

MAURICE DECLUME
IMPRIMEUR - ÉDITEUR
LONS-LE-SAUNIER
1943

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

N°

Contribution à la biochimie de la glucosamine et à l'étude des glucides combinés du sang

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Le 1943

PAR

Josette MARQUET

ANCIEN PRÉPARATEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Examinateurs de la Thèse

MM. J. ROCHE, Professeur, *Président.*
MORIN, Professeur.
DUBOULOZ, Professeur.
DERRIEN, Chargé de fonct. d'agrégé.

Assesseurs

MAURICE DECLUME
IMPRIMEUR - ÉDITEUR
LONS-LE-SAUNIER
1943

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

PERSONNEL DE LA FACULTÉ MIXTE

DE

MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : Lucien CORNIL *Assesseur :* F. MERCIER

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MOITESSIER, CASSOUTE
OLMER, GAUJOUX, COTTE, AUBARET

Chargé de cours honoraire : TIAN.

Secrétaire : J. COMTE *Bibliothécaire :* Mme PEROL.

Professeurs :

Anatomie	N...
Anatomie pathologique et Pathologie expérimentale	CORNIL
Bactériologie	ROUSLACROIX
Chimie analytique et hydrologie	RIMATTEI
Chimie médicale	ROCHE
Clinique chirurgicale	FIOLLE
Clinique chirurgicale	BOURDE
Clinique exotique	HECKENROTH
Clinique des maladies nerveuses	ROGER
Clinique médicale	AUDIBERT
Clinique médicale	MONGES
Clinique médicale	MATTEI
Clinique médicale infantile	GIRAUD
Clinique obstétricale	VAYSSIÈRE
Clinique ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	BREMOND
Clinique urologique	CHAUVIN
Histoire naturelle	N...
Histologie	ROMIEU
Hygiène générale et coloniale	VIOLLE
Médecine légale	MOSINGER
Parasitologie	JOYEUX
Pathologie chirurgicale	MOIROUD
Pharmacodynamie et matière médicale	MERCIER
Pharmacie	VIGNOLI
Physiologie	MORIN
Physique	CHEVALLIER
Thérapeutique	POINSO
Professeur sans chaire	POURSINES
Professeur sans chaire	DUBOULOZ
Professeur sans chaire	SAUTET

Chargés de cours :

Clinique dermatologique ..... VIGNE
Hydrologie thérapeutique ..... PIERI

Agrégés en exercice :

MM. BERTHIER	MM. CHOSSON	MM. AUDIER
BALANSARD	DELPHAUT	DOR
BRAHIC	R. IMBERT.	RECORDIER
FIGARELLA	PAILLAS	SALMON
ARNOUX		

Chargés des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale ..... DERRIEN
Physiologie ..... DONNET

Chargés de Cours complémentaires :

Anatomie descriptive et topographique ..... SALMON
Chimie minérale ..... ARNOUX
Chimie organique ..... DUMAZERT
Clinique de la tuberculose ..... BERTHIER
Clinique des maladies contagieuses ..... PERIOT
Clinique chirurgicale infantile ..... R. IMBERT
Clinique stomatologique ..... ACHARD
Clinique gynécologique ..... FIGARELLA
Médecine opératoire ..... DOR
Microbiologie (Pharmacie) ..... BOYER
Neuro-Chirurgie ..... ARNAUD
Obstétrique ..... CHOSSON
Pharmacodynamie (Pharmacie) ..... DELPHAUT
Psychiatrie ..... ALLIEZ
Toxicologie ..... GUILLOT

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

A MON FRÈRE

Toute ma vive et profonde affection.

A Madame le Docteur Andrée ROCHE

chargée d'agrégation

In mémoriam.

A Monsieur le Professeur Jean ROCHE

membre correspondant de l'académie de médecine

Ma profonde reconnaissance et ma respectueuse admiration.

A Monsieur Christian DUMAZERT

chef de travaux pratiques de chimie biologique
chargé de cours
a la faculté de médecine et de pharmacie de marseille

qui m'a toujours guidé avec bienveillance au cours de ce travail. Je lui exprime mes sentiments de très vive gratitude.

A Monsieur le Professeur M. NICLOUX

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'INSTITUT DE FRANCE
MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

Dont je conserve un souvenir inoubliable, avec mes sentiments respectueux.

A MON JURY DE THÈSE

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE

TABLE DES MATIÈRES.

Pages

AVANT-PROPOS 11

INTRODUCTION 13

I. — La glycémie libre 13

Découverte et nature du sucre libre. 13

Rôle physiologique 15

II. — Les glucides combinés du sang 19

Découverte 19

Distinctions de deux fractions combinées 22

A. — Le sucre protéidique total 25

1° *Constitution* 25

2° *Rôle biologique et physiologique.* 27

B. — La glucosamine 30

1° *Sa répartition dans l'organisme..* 30

2° *Propriétés physiques* 33

3° *Propriétés chimiques* 33

4° *Réactions analytiques* 35

5° *Structure* 36

6° *Rôle de la glucosamine* 37

C. — Le sucre faiblement combiné 42

1° *Propriété et nature* 42

2° *Rôle physiologique* 44

III. — Objet du travail 46

RECHERCHES PERSONNELLES 47

PREMIÈRE PARTIE.

Sur la biochimie de la glucosamine.

I. — Dosage colorimétrique 47

A. — *Exposé des méthodes antérieures..* 47

B. — *Remplacement de la solution de carbonate de sodium par une solution tampon de phosphates* 49

1° *Etude du dosage en fonction de la durée du chauffage à 100° C. de la glucosamine (ClH) avec l'acétylacétone* 50

2° *Détermination du temps nécessaire au développement maximum de la coloration* 51

C. — Technique proposée 52

II. — Etude de la dégradation de la glucosamine 54

A. — Dégradation enzymatique 54

1° *Par les tissus* 54

a) Etude en fonction du pH et du temps 54

b) Etude en fonction de la durée de l'autolyse 56

c) Désamination enzymatique de la glucosamine 59

2° *Par les levures* 62

a) Etude en fonction du pH et temps 62

b) Etude en fonction de la concentration en levure 63

c) Désamination enzymatique .. 65

B. — Dégradation chimique de la glucosamine (ClH) en milieu alcalin..... 65

1° *Décomposition de la glucosamine (ClH) en fonction du pH et du temps* 66

2° *Etude de la décomposition de la glucosamine (ClH) en solution dans la soude* $\frac{N}{10}$ *, par l'emploi des méthodes de dosages colorimétrique et iodométrique* 67

3° *Désamination* 68

C. — La glucosamine peut-elle être considérée comme utilisée à la synthèse biologique de la vitamine C ?..... 70

1° *Recherches poursuivies* in vivo *sur des cobayes* 72
2° *Recherches poursuivies* in vivo *sur des rats* 73

DEUXIÈME PARTIE.

Contribution à l'étude des glucides combinés du sang.

I. — Détermination de la glucosamine dans le sang 75
A. — *Choix d'un déprotéinisant* 76
B. — *Taux de la glucosamine dans le sang et discussion des résultats* 77
II. — Comportement du sucre faiblement combiné chez les diabétiques 78
A. — *Valeur de la glycémie libre, du sucre faiblement combiné et du rapport* $\frac{\text{glycémie libre}}{\text{sucre faiblement combiné}}$ *chez les sujets normaux et les diabétiques non traités* 78
B. — *Chez les diabétiques traités par l'insuline* 80

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES 86

BIBLIOGRAPHIE 93

AVANT-PROPOS.

Cl. Bernard a le premier mis en évidence la présence dans le sang de « sucre » libre et, à la suite de ses travaux, un nombre considérable de recherches ont été entreprises sur l'importante question des glucides sanguins. En effet, la découverte d'osides combinés aux protéines a ouvert un nouveau champ d'investigations.

Parmi les dernières études qui ont été consacrées au sucre protéidique du sang, celles de Bierry et ses élèves ont mis plus particulièrement en lumière son rôle physiologique. Ces mêmes auteurs, Dische, Rimington, ont également établi que cette copule glucidique est constituée par du mannose, du galactose et de la glucosamine, ce dernier glucide s'avérant d'un comportement complexe, tant au point de vue chimique que biologique.

En outre C. Dumazert et G. Penet ont montré récemment l'existence d'une fraction glucidique faiblement combinée aux protéines et ils l'ont assimilée au « sucre virtuel » de Lépine et au glucide X de Fontès et Thivolle. Les recherches poursuivies au Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille, confirment les prévisions de Lépine sur le caractère de la fonction biologique de cette fraction.

La première partie de cet exposé résume, d'une façon succincte, les données établies sur la glycémie libre. Elle contient ensuite une étude plus détaillée des travaux antérieurs sur les sucres combinés, particulièrement sur l'un de leurs constituants, la glucosamine, au sujet desquels nous avons poursuivi des recherches exposées dans la deuxième partie de ce travail.

INTRODUCTION.

I. — LA GLYCÉMIE LIBRE.

Le sang des vertébrés contient à un taux relativement constant du glucose libre. Nous ne citerons ici que les principales étapes des recherches qui ont permis d'établir ce fait et quelques problèmes s'y rattachant.

Découverte et nature du sucre libre.

C. Bernard [2], Pavy ont prouvé l'existence d'une substance glucidique dans le sang des mammifères supérieurs. S'ils ne sont pas parvenus à caractériser dans les filtrats de déprotéinisation, la substance glucidique elle-même, les recherches qu'ils entreprirent par voies chimiques et physiques leur firent présumer que ce sucre présente de grandes analogies avec le glucose. Plus tard Pichard [61] puis Miura [51], obtinrent, à partir du sang, une osazone dont les constantes physiques étaient très voisines de celles de la glucosazone ; mais le fructose, le glucose, le mannose et la glucosamine donnent naissance à la même osazone, et les recherches sur la nature de cette substance glucidique devaient être poursuivies. Certains biologistes, comparant les résultats obtenus par la méthode de réduction et la méthode polarimétrique, aboutirent à des conclusions contradictoires. (Hédon [34], Lépine [44], Hanriot [33], Viale).

En 1930, cent ans environ après la découverte de Cl. Bernard, Winter [74] établit que le sang contient du glucopyranose. Cependant le désaccord qui existe, entre le pouvoir réducteur et le pouvoir rotatoire d'un même dialysat sanguin conduisent les biologistes (entre autres,

Bigwood et Thomas [71]) à discuter les résultats de Winter du point de vue quantitatif.

A. Hewitt et J. Pryde [39] ont montré que dans l'organisme le glucose se transformerait partiellement en « forme active ». Donc une partie seulement du sucre libre serait constituée par du glucopyranose, puisque ce dernier représente une forme stable du glucose.

Par ailleurs, des auteurs ont pensé expliquer les divergences entre le pouvoir rotatoire et le pouvoir réducteur, en invoquant l'existence dans les dialysats sanguins, de substances réductrices et optiquement actives, autres que le glucose.

D'après J. Thomas [71] cette hypothèse est à rejeter du fait qu'après fermentation par la levure, le pouvoir rotatoire et le pouvoir réducteur qui subsistent, sont trop faibles pour expliquer les phénomènes observés avant fermentation des dialysats sanguins. Par contre, cet auteur a montré que les dialysats sanguins présentent d'importantes variations de leurs propriétés optiques en fonction du pH, mais que ces dernières « ne peuvent être attribuées à l'action des substances interférentes dont la présence est connue dans le sang, telles que les acides aminés, l'acide lactique, car leur grandeur dépasse de beaucoup celle des variations que représenteraient les substances en question » entre les mêmes limites de pH.

Les dosages du pouvoir réducteur du sucre sanguin demandent une grande prudence, quant à leur interprétation. On voit, en effet, que les dialysats ou les filtrats de déprotéinisation préparés en vue du dosage de la glucidémie libre, contiennent le plus souvent, des substances de nature non glucidiques, mais douées de propriétés réductrices vis-à-vis du réactif mis en œuvre pour évaluer le pouvoir réducteur du sucre sanguin. Ainsi, lorsqu'on évalue la glycémie par le dosage du pouvoir réducteur, on détermine la totalité des substances réductrices et non « le sucre vrai ». D'où une importante source d'erreurs par excès, attribuée à juste titre à l'imperfection des procédés de déprotéinisation du sang.

Hollinger et plus tard Folin et Svedberg confrontant les valeurs des glycémies d'un même sang en employant des méthodes de déprotéinisation différentes, concluent à la présence d'un sucre autre que le glucose. De plus le filtrat de déprotéinisation d'un sang, possède encore après fermentation un faible pouvoir réducteur. C'est le « reste de fermentation ». J. Roche [63] a montré que les substances qui le constituent sont en partie des produits azotés, sulfurés ou phosphorés. Le choix du déprotéinisant s'avère donc très important pour éliminer ces substances au maximum. Le reste de fermentation est pratiquement nul quand on emploie, comme déprotéinisant, les sels de mercure, de cadmium ou leurs associations (C. Dumazert [13]).

Le problème de la forme isomérique mis à part, la démonstration prouvant que la substance glucidique libre du sang est constituée uniquement par du glucose, n'avait pas été faite d'une façon formelle. C. Dumazert et G. Penet [16] ont apporté de nouveaux arguments qui, joints aux travaux antérieurs, permettent de conclure que « le glucose est le seul glucide du sang existant à l'état libre dans le plasma sanguin ». En effet, ils ont montré, par une étude systématique de la fermentation du plasma, que le sucre sanguin se comporte à l'égal du glucose sous l'action de la levure de bière.

Rôle physiologique.

La place occupée par le glucose du sang dans le métabolisme intermédiaire, les troubles graves observés lors de la chute ou de l'élévation de son taux normal, lui font attribuer un véritable rôle fonctionnel.

La valeur de la glycémie a été particulièrement étudiée par Baudoin [1] et Bierry [6]. Chez l'homme normal, à jeun, son taux varie entre 0,80 et 1,20 g. Le maintien de la glycémie à un taux constant est assuré par un mécanisme neuro-humoral complexe. Aussitôt après l'in-

troduction du glucose dans l'organisme, il est mis rapidement en réserves dans les espaces lacunaires (Bugnard et Soula). Rendu progressivement à la circulation générale, il passe lentement sous forme de glycogène dans les tissus musculaires et le foie. S'il est introduit en quantité très élevée, il peut aussi se transformer en lipides.

Le mécanisme des transformations du glucose du sang est réglé, en grande partie, par l'insuline, hormone sécrétée par les ilots de Langherans du pancréas, et dont l'action a été mise en évidence pour la première fois simultanément par Hédon, par Von Méring et Minkowski. Elle s'oppose à la glycogénolyse et favorise l'utilisation du glucose par les tissus.

Le taux de la glycémie influe directement sur la sécrétion de l'insuline, l'hyperglycémie appelle l'hyperinsulinémie (Gay, Zunz et Labarre). D'autre part, Santenoise, Valette et Stankoff [67] ont pratiqué des expériences avec la vagotonine, hormone pancréatique distincte de l'insuline. Ils l'ont employée purifiée et complètement débarassée d'insuline et ont montré son rôle glycogénopéxique. Le sympathique est considéré comme un inhibiteur de la sécrétion insulinienne.

L'action des hormones surrénales et hypophysaires, intervient pour rétablir la glycémie à son taux normal quand celui-ci tend à s'abaisser. La sécrétion de l'adrénaline est déclanchée par l'excitation de la médullo-surrénale, par l'intermédiaire de l'acétylcholine. Elle accroît la glycogénolyse, limite les transformations du glucose mais l'adrénaline administrée par injections répétées, ne provoque pas un véritable diabète. Le lobe antérieur de l'hypophyse sécrète une hormone appelée diabétogène dont l'action sur la glycémie est équivalente à celle de l'adrénaline (Young, Hédon et Loubatières). Il faut noter également l'action glycorégulatrice de la corticosurrénale et celle de la thyroxine. Cette dernière agit en activant la diastase glycogénolytique et en excitant la sécrétion de l'adrénaline. D'autres glandes, la rate, (Bierry, Rathery et Levina [6]), le thymus chez le jeu-

ne, jouent également un rôle dans le maintien de l'équilibre de la glycémie.

Dans certains cas pathologiques le taux de la glycémie dépasse ses limites normales. Dépendant à la fois d'apport exogène (vitamines B) (Funk [30], Braddon et Cooper), de l'équilibre endocrinien et du système nerveux, le dérèglement de l'un de ses facteurs entraîne des troubles divers. Les hyperglycémies hépatiques, consécutives à une insuffisance glycogénopexique du foie, thyroïdiennes, surrénaliennes et hypophysaires, ne se rencontrent pas souvent et les hypoglycémies surrénaliennes sont également rares (maladies d'Addison).

Par sa fréquence et sa gravité le diabète est le plus important. Il est marqué par une hyperglycémie dont le taux très variable peut atteindre et dépasser 4 g. de glucose par litre. A ce moment, le seuil d'élimination du glucose est dépassé et les reins éliminent l'excédent du sucre. L'indice chromique résiduel augmente (Polonovski) par suite de l'accumulation de produits intermédiaires du métabolisme des glucides. On note une élévation du taux de la lipémie et du métabolisme basal, une diminution du quotient respiratoire. Dans les formes graves, l'utilisation des glucides étant presque nulle, les graisses sont métabolisées, le mécanisme de leur dégradation, en l'absence de combustion des glucides, se modifie et on observe de l'acétonurie et de l'acidose. Lorsque les albumines sont également utilisées, l'azotémie se manifeste.

Telles sont énoncées très schématiquement, les principales conséquences biologiques du diabète. Mais là ne s'arrêtent pas ses répercussions. C. Dumazert et M. L. Détieux ont en effet étudié la fermentation du sang total de sujets normaux et diabétiques sous l'action de levure de bière. Ils ont observé que, chez les sujets normaux, cette fermentation présente de grandes analogies avec la glycolyse. Dans ces conditions, il ne se forme pas d'alcool, et le glucose sanguin est dégradé en acide lactique. Par contre l'étude poursuivie chez les diabétiques leur a montré que dans ce cas, il se forme de l'alcool au cours

de la fermentation du sang total. Ces quantités d'alcool restent inférieures à celles que permettrait de prévoir le taux de glucose existant. Elles sont notées non seulement chez le diabétique, mais dans les liquides de laquage provenant de sang de sujets normaux et additionné de quantités croissantes de glucose. D'autre part, il ne se forme pas d'alcool dans les sangs de diabétiques, lorsque leur glycémie a été ramenée à la normale par l'insuline. Ils ont ainsi établi que la formation d'alcool observée au cours de la fermentation de sangs totaux hyperglycémiques, a pour *unique* cause une teneur en glucose supérieure à la glycémie normale et non pas une anomalie du système glycolytique du diabétique (1).

Quand, sous l'action de la levure de bière, il apparaît dans le sang diabétique de l'alcool, ces auteurs supposent que le système glycolytique est alors débordé du fait d'un excès de glucose et concluent à un métabolisme anormal des glucides. Ils insistent, comme l'ont déjà fait Chabannès et Lobo-Onell sur l'intérêt qu'il y a à réduire systématiquement l'hyperglycémie et à ne pas se contenter d'une suppression de la glycosurie dans le traitement du diabète, mais à réduire l'hyperglycémie.

De plus H. Bierry [6] a recherché les variations du sucre protéidique dans cette affection et nous-même avons étudié le comportement du sucre faiblement combiné.

La fréquence des lésions pancréatiques au cours du diabète (Boucharda), la réalisation d'un véritable diabète expérimental par pancréatectomie totale (Hédon, Von Mering et Minkowski), les remarquables travaux d'Hédon, Laguesse et d'autres chercheurs, amènent à considérer l'hypoinsulinémie comme la cause directe du diabète. La chute de la glycémie que provoque d'administration d'insuline, peut être en relation avec ses groupements guanidiques car on note les mêmes effets avec un certain nombre de dérivés guanidiques, entre autres la syntaline. Mais le rôle principal doit sans doute revenir

(1) Encore inédit, ce travail paraîtra dans le *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943.

aux radicaux sulfurés qui s'y trouvent sous forme de disulfure (cystine) et de thiols (cystéine).

Les deux grands processus qui assurent l'équilibre glycogénique sont la glycogénolyse et la glycogénogénèse.

Lors de la contraction musculaire, le glycogène est transformé en acide lactique ; une fraction de ce dernier est oxydé et l'énergie ainsi libérée, sert à retransformer en glycogène le reste d'acide lactique. A cette réaction couplée d'oxydation et de synthèse on a donné le nom de « réaction de Pasteur-Meyerhof ». Mais c'est là une représentation très schématique de la réaction, qui se fait par dégradation successive de toute une série de produits intermédiaires, entre le glycogène, forme de réserve, et les produits ultimes de dégradation des glucides : CO_2 et H_2O. Les remarquables travaux de Meyerhof, Dische, Neuberg ont précisé les étapes principales du métabolisme des glucides au cours de la contraction musculaire et de la glycolyse.

Le rôle particulier de la fraction des glucides faiblement combinés signalé par C. Dumazert et Penet laisse à penser que cette fraction est probablement un intermédiaire intéressant du métabolisme des glucides sanguins.

II. LES GLUCIDES COMBINÉS DU PLASMA SANGUIN.

Découverte.

De nombreux travaux ont été consacrés à la recherche dans le sang d'autres glucides que le « sucre libre » ; ils ont établi qu'il existe des glucides à l'état de combinaisons avec les protéines sériques et l'on a montré, par la suite, que beaucoup de protéines contiennent des glucides dans leurs molécules (groupement prosthétique glucidique).

Diverses techniques furent successivement employées

pour obtenir la dislocation des molécules protéiques ; celle-ci donne alors naissance à des corps organiques de constitution beaucoup plus simple parmi lesquels des oses et des osides.

Le chimiste français Braconnot mit le premier en évidence l'hydrolyse que les acides forts imposent à la molécule protéique. Utilisant cette méthode, en 1855 Figuier [24] emploie l'acide nitrique, et montre qu'un tel hydrolysat fermente au contact de la levure de bière. C'est Lehmann [44 *bis*] qui tire des conclusions de ces recherches et admet que le plasma contient une sorte de combinaison glucidique, dont le traitement par l'acide nitrique sépare par dédoublement un sucre fermentescible. D'autres auteurs parmi lesquels Habermann et Hlasiwetz, Lépine [45], Pavy [53], Morner [52], employant des techniques d'hydrolyse différentes, montrent que les protéines sériques donnent naissance à une série de corps présentant les caractères analytiques des glucides.

Schutzenberger fait une hydrolyse alcaline de l'ovalbumine et ses résultats sont identiques à ceux obtenus sur la même molécule protéique au cours de l'hydrolyse par les acides forts. Il met aussi en évidence la formation d'un principe ayant certains caractères des glucides et qu'il appelle « l'amide cellulosique ». Il la considère comme très voisine de la cellulose.

Plus tard S. Frankel [28] soumet l'albumine de l'œuf à l'hydrolyse acide et distingue dans les produits de dégradation, la présence d'un corps organique, ayant des propriétés réductrices sur la liqueur de Fehling, il lui donne le nom d'« albamin ». Il montre aussi que l'hydrolyse acide peut être remplacée par l'action des sucs digestifs qui conduit à l'obtention du même composé. L'étude chimique de cet « albamin » le révèle de constitution très voisine de celle de la glucosamine.

Enfin S. Frankell et Jellinek [29], étudiant de nouveau la question de l'hydrolyse de l'ovalbumine, démontrent que cette opération libère du mannose et de la glucosamine. Ces résultats sont pratiquement en accord avec ceux trouvés par les collaborateurs de Levene en 1929.

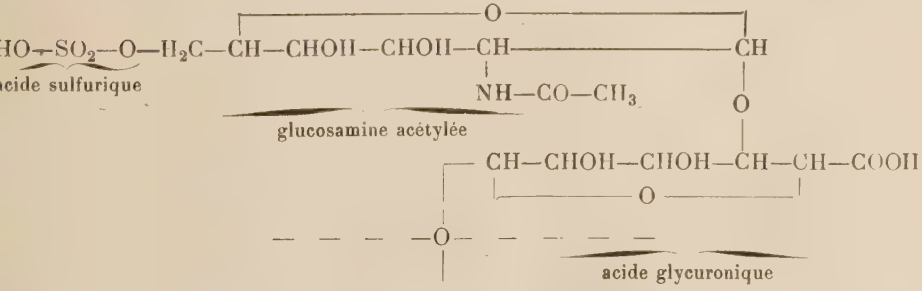
Ces auteurs ont reconnu que la copule glucidique de l'ovalbumine est constituée par quatre trisaccharides comprenant chacun une molécule de glucosamine et deux de mannose.

Des recherches ont été également poursuivies sur les mucoprotéides. Parmi celles-ci les mucines sont très répandues dans l'organisme ; on les rencontre dans les sécrétions des épithéliums de recouvrement du tube digestif, des acini salivaires, de l'appareil respiratoire et de l'appareil génital. On les trouve aussi dans l'urine, le liquide synovial et celui de certains kystes pathologiques ainsi que dans le corps vitré de l'œil et le cordon ombilical.

Ces corps sont des hétéroprotéides constitués d'une protéine et d'un groupement prosthétique glucidique. Sous l'action de la soude étendue, la molécule de mucine se scinde en deux éléments : une protéine qui confère sans doute, à chaque mucine, sa spécificité et un groupement prosthétique acide : l'acide mucoïtine sulfurique.

Les mucines donnent les réactions des protéines. Elles précipitent par les réactifs de Tanret, de Patein et de Millon et la réaction de Molisch positive, caractérise le groupement glucidique. Elles réduisent la liqueur de Felhing après une hydrolyse acide qui libère le sucre.

Landewehr le premier reconnaît un hydrate de carbone dans les produits de dédoublement de la mucine sous maxillaire. Levene approfondit l'étude des mucoprotéides et propose le schéma suivant pour l'acide mucoïtine sulfurique :



Mais tous les complexes mucoïtiques n'auraient pas cette structure ; ainsi Blix distingue, dans la mucine sous maxillaire, deux osides différents ; l'un comprenant de l'hexosamine, l'autre un triholoside voisin du polyholoside du plasma sanguin.

Le cartilage et la paroi artérielle possèdent des substances chondroïdes différant de la mucine par le sucre aminé qui est ici la galactosamine. Certaines substances de dégénérescence de la rate, du foie et du rein, dites amyloïdes, renferment des groupements prosthétiques semblables.

Nous examinons maintenant les principaux travaux qui précisent la nature et le rôle des glucides combinés aux protéines sériques.

Lépine a consacré de nombreux travaux aux sucres combinés du sang. De même Bierry, qui appelle « *sucre protéidique* » la totalité des glucides libérés après hydrolyse des protéines sériques.

« Ce sucre qui fait partie intégrante de la molécule, n'est pas un constituant universel de la matière protéique, il est au contraire particulier à certains protéides sanguins. Il diffère par sa structure, des polysaccharides renfermés dans les protéines de l'œuf, les mucines, la lactalbumine, la caséine, les albumines végétales. Il constitue bien un groupement prosthétique, le mot prosthétique impliquant seulement que le groupe en question est de composition autre que les amino acides » (Bierry [4]).

Distinction de deux fractions combinées parmi les glucides combinés du sang.

Des controverses se sont élevées sur la question de savoir si le sucre protéidique est constitué par une seule ou plusieurs fractions glucidiques. Lépine fut un des premiers à envisager l'existence de deux fractions dinstinctes : une « faiblement combinée » aux protéines et une autre « fortement combinée ». Il n'est pas par-

venu à déterminer la nature de la première fraction qu'il a surnommée « sucre virtuel », « sucre existant en puissance, ayant le pouvoir de servir immédiatement aux besoins de l'organisme ». (*Loc. cit.* [45]).

D'autre part, en 1928, Fontès et Thivolle [27] admettent la présence dans le plasma sanguin d'un glucide qu'ils appellent « glucide X ». Pour l'évaluer ces auteurs se basent sur le fait que ce corps précipite par le nitrate mercurique. La différence de pouvoir réducteur observée entre les filtrats de déprotéinisation tungstique et ceux de déprotéinisation mercurique en permet le dosage. Ils emploient leur méthode molybdomanganimétrique. Ils n'ont ni isolé, ni nettement caractérisé ce glucide, mais ils ont observé les faits suivants :

1° Il fermente sous l'action de la levure de bière. 2° Il subit des variations importantes *in vivo* après injection à l'animal d'adrénaline ou d'insuline.

A ces résultats, Bierry objecte que certains déprotéinisants, l'acide tungstique entre autres, laissent passer dans le filtrat de déprotéinisation une plus grande quantité de corps réducteurs présents dans le sang, que le déprotéinisant mercurique. Bierry doute donc de la nature glucidique du « glucide X » de Fontès et Thivolle.

Les travaux de C. Dumazert et G. Penet [16] remettent en question l'existence d'une fraction glucidique faiblement combinée. C'est en recherchant une microméthode de dosage du sucre protéidique, que l'attention de ces auteurs fut retenue par une fraction glucidique libérée au cours de l'hydrolyse du plasma avec un acide faible. Leurs premières expériences leur permirent de conclure que « l'hydrolyse du plasma par l'acide acétique, libère spécifiquement certains constituants du sucre protéidique, mais demeure impuissante à mettre en liberté les autres constituants de ce dernier ». Ils font alors une étude systématique et comparative de la valeur de la glycémie libre, des glucides libérés par hydrolyse acétique, et du sucre protéidique total à partir d'un même plasma, sur différentes espèces animales. Ils constatent,

d'une part, que les valeurs des sucres libérés par acétolyse sont assez constantes chez chaque espèce animale, et d'autre part, que les variations du taux des glucides libérés dans ces conditions, *sont toujours indépendantes* de celles du sucre protéidique total.

Ils ont également montré le caractère de fermentescibilité de la fraction glucidique libérable par hydrolyse au moyen d'un acide faible. Après acétolyse, le plasma soumis à la fermentation donne naissance à une quantité d'alcool, supérieure à celle que l'on obtient quand on fait fermenter ce même plasma sans hydrolyse préalable. Grâce à la technique de dosage des glucides fermentescibles mise au point par ces auteurs, il leur a été possible de calculer que l'excès d'alcool ainsi obtenu correspond à une quantité de glucide, exprimé en glucose, équivalente à celle des glucides libérés par acétolyse, et dosée, par ailleurs, par la méthode de réduction.

De l'ensemble de leurs recherches sur la nature des glucides combinés du sang, ils ont conclu à l'existence d'au moins deux fractions :

« 1° Une fraction libérable par les acides faibles ou par les acides forts très dilués ; il s'agit donc d'une fraction glucidique faiblement combinée. Cette dernière est entièrement fermentescible.

2° Une fraction constituée par des glucides libérables seulement par un processus d'hydrolyse mettant en œuvre l'acide sulfurique en solution normale. Cette fraction est donc caractérisée par le fait qu'elle est fortement combinée aux protéides sanguins ». (Dumazert et Penet [16]).

Il nous semble qu'actuellement l'étude du sucre combiné du sang doit donc comprendre deux parties :

1° Le sucre protéidique total : somme des fractions faiblement et fortement combinées aux protéines.

2° Le sucre faiblement combiné.

A. — *SUCRE PROTÉIDIQUE TOTAL.*

1° ***Constitution.*** — En ce qui concerne l'étude du sucre protéidique total, Bierry a montré que l'on avait intérêt à travailler sur le sérum. Il a déterminé la nature de cette copule glucidique : il s'agit d'un triholoside constitué par du galactose, du mannose, et de la glucosamine. L'enchaînement des trois oses est le suivant : galactose — acétylglucosamine — mannose. Cette fraction glucidique combinée est détachée des protéines par les alcalis, ou par destruction des protéides au moyen d'enzymes protéolytiques, ainsi que par les acides. Ceux-ci réalisent en outre l'hydrolyse du polyholoside, libérant ainsi les oses de constitution.

Cependant les biochimistes ont cherché à déterminer si le groupement prosthétique glucidique est fixé électivement sur certaines protéines, ainsi que les proportions de glucides présents, par rapport aux protéines. L'ensemble de leurs résultats permet de présumer l'existence de plusieurs polyholosides, constituant les groupements prosthétiques des protéines sériques et dont le plus important serait le triholoside isolé par Bierry.

En effet Hewitt a étudié les protéines isolées du sérum sanguin et il a distingué une fraction protéique ne renfermant pas de groupement prosthétique et une deuxième fraction contenant 8,5 p. 100 de glucides, qu'il appelle « seroglycoïde ». Il met en évidence dans celle-ci, la présence de galactose, de mannose et de glucosamine. Il a également isolé une globuline : le globoglycoïde, renfermant 7,50 d'un triholoside ; celui-ci diffère du précédent, par la présence de glucose et l'absence de mannose [37].

D'autre part, au cours de ces recherches sur la sérum albumine et sur la sérum globuline, Sörensen a déterminé les proportions relatives des glucides libérés après hydrolyse. Il a remarqué que les quantités de glucosamine sont plus grandes que celles correspondant au trisaccharide proposé par les auteurs précédents, à savoir

deux molécules d'hexoses et une molécule de glucosamine [69].

Rimington [62] n'a jamais caractérisé le galactose et a admis l'existence d'un glucosamino-dimannose. Dische [12 *bis*] a formulé des conclusions analogues à celles de Bierry.

Par la suite, ce dernier auteur [5] a observé, comme Sörensen, que les glucides combinés aux protéines sont principalement localisés sur les globulines. Il a alors cherché à caractériser les différentes fractions d'euglobulines par la nature et le taux des glucides qui leur sont combinés. Il a fractionné dans la sérum-globuline, les euglobulines I, II, III, IV et il a mis en évidence dans chacune d'elles, la présence du complexe galactose-acétyl-glucosamino-mannose. Il évalue, d'une part, le trisaccharide globalement et d'autre part, les groupes galactose-mannose et glucosamine séparément. Voici ses conclusions. L'euglobuline I renferme de fortes proportions de glucides. L'euglobuline II en est moins riche, les euglobulines III et IV sont présentes dans le sérum en faibles proportions et leur teneur en glucides est inférieure à celle des précédentes. Quant au rapport

$$\frac{\text{mannose} + \text{galactose}}{\text{glucosamine}}$$

il est voisin de 2/1 pour les euglobulines I et de 3/1 pour les euglobulines II.

D'autres faits permettent indirectement de conclure à une pluralité, en ce qui concerne les glucides combinés du plasma. On sait en effet, qu'il est possible d'isoler, des différents pneumocoques, des glucides spécifiques de chacun d'eux. Le glucide III, extrait du pneumocoque III, a été copulé avec une protéine quelconque. Ce complexe, injecté à un animal, s'est montré doué de propriétés spécifiquement immunisantes vis-à-vis du pneumocoque III (Velluz [72]). Une telle expérience contribue grandement à montrer que les processus immunologiques de l'infection considérée, s'accompagnent de l'apparition dans le sang de complexe protéidoglucidique.

Ce rapide aperçu des divers résultats, obtenus sur les protéines isolées, permet de présager que des recherches systématiques poursuivies sur les fractions purifiées de la sérum globuline et de la sérum albumine, révèleront, à côté du triose : galactose — acétylglucosamino — mannose (Bierry) d'autres groupes de polysaccharides.

2° ***Rôles biologique et physiologique.*** — C. Dumazert et Penet [19] ont montré que les glucides fortement combinés ne fermentent pas au contact de la levure de bière dans les conditions de leurs expériences. Ils ont également étudié la participation des glucides combinés au phénomène de la glycolyse et ils ont constaté que la disparition du sucre faiblement combiné est parallèle à celle du sucre libre. Comme pour ce dernier, elle est complète entre 6 et 8 heures. Pendant ce même temps, le taux des glucides, libérables seulement par l'acide sulfurique, a une tendance nette à s'élever au début du phénomène. Ces auteurs pensent que cette augmentation peut traduire la formation de glycogène à partir des glucides sanguins qui participent à la glycolyse, comme l'avaient envisagée Willstätter et Rhodewald [75].

Chez les animaux supérieurs la teneur en sucre protéidique du sérum sanguin est variable suivant les espèces. Bigwood et Vuillot [7] donne un taux de 4 à 5 g. p. 1.000 cm^3 (ces quantités étant exprimées en glucose), mais ces résultats sont beaucoup plus élevés que ceux trouvés par les autres auteurs. Ceci provient du fait que la déprotéinisation zincique utilisée par cet auteur en vue du dosage des glucides des hydrolysats sanguins par la méthode de Hagedorn-Jensen, laisse passer dans les filtrats, des substances réductrices non glucidiques en quantités importantes.

Bierry également a proposé une méthode de dosage du sucre protéidique total à partir du plasma sanguin [6], et à partir des protéines isolées [4]. A la suite des dosages pratiqués sur des plasmas de chevaux, il a trouvé comme chiffres extrêmes 1,80 g. et 2,60 g.

C. Dumazert et G. Penet [16] ont mis au point une technique pour le microdosage du sucre protéidique total. L'étude de l'hydrolyse du plasma réalisée au moyen d'un acide faible ou d'un acide fort en solution très diluée, a permis à ces auteurs de montrer que la totalité des glucides combinés n'est pas libérée dans de telles conditions. Ils ont cherché à obtenir l'hydrolyse complète des glucides combinés en augmentant progressivement les quantités d'acide sulfurique au cours de l'expérience. Après une étude systématique, ils ont adopté la technique suivante pour le dosage des glucides combinés totaux :

La glycémie initiale est dosée par la méthode de Hagedorn et Jensen. Soit A sa valeur. Le microdosage du sucre protéidique est réalisé de la manière suivante : dans un tube à essais, d'une longueur de 15 cm. environ et muni d'un petit bec, on introduit 2 cm³ du réactif suivant :

Sulfate de cadmium cristallisé pur....	13 g.	
Acide sulfurique 2 fois normal.....	530,25	cm³
Eau distillée q.s.p.....	1.000	cm³

On ajoute 0,05 cm³ de plasma mesuré avec les précautions d'usage et on porte au bain-marie bouillant pendant 2 heures, après avoir agité avec une petite baguette de verre. On laisse refroidir et on ajoute alors peu à peu, et en agitant, 1 cm³ d'une solution de soude 2,275 normale, laquelle permet à la fois la neutralisation de l'acide introduit pour l'hydrolyse et la précipitation de l'hydrate de cadmium qui assure la déprotéinisation. On filtre (sur papier filtre sans cendres) et on lave le précipité à trois reprises avec chaque fois 2 à 3 cm³ d'eau distillée. On recueille le filtrat et les eaux de lavage dans un gros tube à centrifuger, en vue du dosage par la méthode de Hagedorn et Jensen. Le filtrat doit être parfaitement limpide, incolore et neutre au papier de tournesol. Soit B la valeur des glucides totaux ainsi trouvés et exprimés en grammes de glucose par litre de plasma. La différence B — A (sucres totaux moins sucre libre) représente la quantité, exprimée en g. de glucose p. 1.000 cm³ de plasma, de

glucides réducteurs, combinés aux protéines et mis en liberté par l'hydrolyse.

C. Dumazert et G. Penet ont constaté que le sucre protéidique total présente des variations importantes, pour divers sujets d'une même espèce ; mais on peut considérer que chez l'homme normal il oscille entre 2,50 g. et 2,70 g.

De plus, la proportion des différents glucides entrant dans la copule glucidique, présente des différences quantitatives chez les diverses espèces, ainsi que parmi les individus d'une même espèce.

Bierry [6] a longuement étudié le rôle physiologique du sucre protéidique total. Il a d'abord constaté que les deux oses et l'aminohexose sont tous trois assimilables par l'organisme, le mannose tout particulièrement. Au cours des variations de la glycémie provoquées par des facteurs physiologiques ou expérimentaux il a constaté généralement une stabilité du sucre protéidique total beaucoup plus grande et il a montré qu'il existe une indépendance nette entre l'état du glycogène du foie et celui du sucre protéidique dans le système porte sus-hépatique. Bierry a presque invariablement observé une élévation du taux du sucre protéidique dans le cancer, la tuberculose pulmonaire et certains états infectieux. Il a particulièrement insisté sur les cas de néphrites et du diabète. Ses conclusions peuvent être résumées ainsi : au cours du diabète simple ou consomptif, le sucre protéidique est souvent, mais pas toujours augmenté. Il se montre plus stable que le sucre libre. Sur ce point le diabète humain se différencie profondément du diabète expérimental. En effet, dans ce cas, on note toujours une hyperprotéidoglycémie très nette. Le sucre protéidique total ne se montre pas sensible à l'insuline. Par contre, il est habituellement élevé dans les néphrites, alors que jusqu'ici on n'avait noté que des troubles du métabolisme azoté.

L'étude de Bierry sur la nature du copule glucidique

des protéines plasmatiques montre que les chaînes polypeptidiques qui constituent les protéides semblent être reliées entre elles par des groupements glucidiques, ceux-ci se trouvant encastrés dans la molécule protéique ; ils joueraient un rôle dans les réactions de dissociations et constitueraient des facteurs essentiels de diverses activités. Et Bierry conclue en rappelant « une conception nouvelle qui envisage les protéines réduites à un seul assemblage d'acides aminés, comme une sorte de dépôt, de matière de réserve de l'organisme. Des protéines destinées à remplir un rôle important dans les processus vitaux, renferment, par contre, un groupement prosthétique véritable centre d'activité ».

Si les caractères du galactose et du mannose sont connus avec précision, il n'en est pas de même de la glucosamine au sujet de laquelle de nombreux problèmes restent encore à résoudre.

Nous donnons, dans le paragraphe suivant, un résumé des travaux qui lui ont été consacrés.

B. — *LA GLUCOSAMINE.*

Parmi les trois oses qui constituent le groupement prosthétique des séro et globoglycoïdes, la glucosamine présente un caractère particulier. Sa formule est la suivante :

$$\begin{array}{l} \quad\quad NH_2 \\ \quad\quad | \\ CHO—CH—(CHOH)_3—CH_2OH \end{array}$$

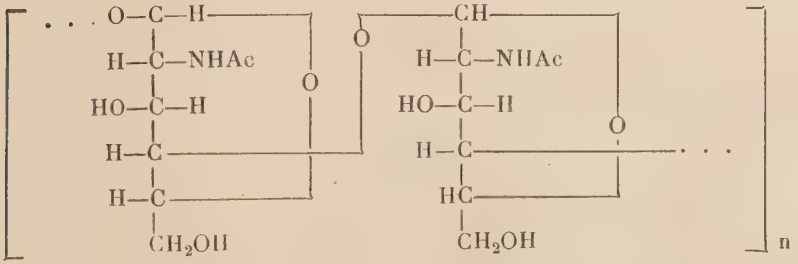
Sa structure glucidique lui confère les principales qualités de tous les corps de ce groupe, mais la fonction aminée lui donne des caractères bien spécifiques.

1° ***Sa répartition dans l'organisme.*** — Nous avons vu qu'elle fait partie de la plupart des groupements prosthétiques glucidiques des protéines : on la rencontre dans les mucoprotéines où sa fonction est encore mal connue. Une substance voisine de l'acide mucoïtine-sulfurique

contenant de la glucosamine a été également isolée du foie : c'est l'héparine que l'on retrouve dans différents tissus ; elle a la propriété d'inhiber la coagulation du sang.

Une parenté chimique a été trouvée entre le polysaccharide du groupe sanguin A et une substance isolée du pneumocoque IV ; ces substances présentent des réactions semblables et sont constituées, entre autres, d'acétylglucosamine et de galactose. Enfin, c'est un fait général que les toxines glucidiques chauffées plusieurs heures à 100° C. en milieu fortement acide, se décomposent totalement et on peut identifier, parmi les produits de leur hydrolyse, des sucres proprement dits, des hexosamines, la glucosamine tout spécialement et des acides organiques. La matière réductrice glucidique représente parfois 40 à 50 p. 100 des toxines. (A. Boivin).

On trouve également la glucosamine dans la chitine animale et végétale (champignons, carapaces de crabes, homards, crevettes, insectes, vers, etc...). C'est une substance lourde, amorphe, insoluble dans l'eau, dans les solvants organiques, dans les solutions alcalines, mais soluble dans les acides concentrés (ClH et SO_4H_2). La glucosamine en est le seul constituant sous forme acétylée. Des recherches récentes ont établi que la structure de la chitine serait :



Par digestion dans l'acide chlorhydrique concentré, on obtient 85 p. 100 de d-glucosamine et 22 p. 100 d'acide acétique ce qui correspond à une molécule de glucosamine par groupement acétylé.

Un enzyme de l'hépatopancréas de l'escargot hydrolyse la chitine en N-acétyl-glucosamine. Le même enzyme donne à partir de la chitosane des polyglucosamines très stables. La chitosane existe également dans l'émulsine, ainsi que dans l'aspergillius.

C'est à partir de la chitine qu'on prépare la glucosamine.

Préparation de la glucosamine. — Des carapaces de crustacés sont grossièrement concassées puis traitées longuement, à froid, par de l'acide chlorhydrique dilué (10 p. 100) jusqu'à décomposition complète des carbonates. On se débarasse ensuite des débris protéiques par plusieurs macérations dans une lessive de soude à 10 p. 100. Enfin on lave abondamment à l'eau puis on dessèche le résidu qui est de la chitine presque pure. Celle-ci est alors hydrolysée par l'acide chlorhydrique concentré à l'ébullition, pendant 3 ou 4 heures. On dilue alors la liqueur noirâtre avec de l'eau distillée et on décolore par le noir animal. C. Dumazert préconise à partir de cet instant, d'opérer ainsi : évaporer la liqueur aussi bien décolorée que possible *à sec*, sous pression réduite. Le résidu est arrosé d'alcool absolu ; porter à l'ébullition, laisser refroidir, filtrer. L'alcool entraîne presque toutes les impuretés et il reste une masse cristalline de chlorhydrate de glucosamine. La purification consiste à dissoudre ces cristaux dans le minimum d'eau, puis en ajoutant, peu à peu de l'alcool fort, on obtiendra de très beaux cristaux de glucosamine (HCl) très purs dont la teneur en azote est théorique.

La glucosamine a toujours été trouvée acétylée, aussi bien dans le règne végétal que dans le règne animal. Bierry [4] a déterminé cette structure dans le sucre protéidique du sang. Il s'est basé sur les observations suivantes : la condensation de l'acétylglucosamine avec la p-diméthylaminobenzaldéhyde, en milieu acide (acétique), provoque l'apparition d'une coloration pourpre (Zuckerhandl et Messiner-Klebermass, T. J. Morgan et L.

Elson). Cette réaction est spécifique, elle permet de caractériser avec certitude les N-acétylhexosamines et de les doser. La glucosamine, la chondrosamine et aussi le 3-aminoglucose ne fournissent aucune coloration.

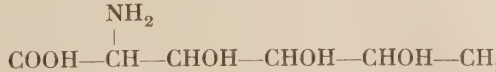
Les aminopolyholosides renfermant de la N-acétylglucosamine ne donnent pas cette réaction avant d'avoir subi une hydrolyse légère. L'impuissance de ces polysaccharides à produire cette réaction, tient à l'absence du groupe aldéhydique terminal des unités acétylhexosamines par suite de l'inclusion de ce groupe dans les liaisons glucosidiques avec les oses voisins. D'autre part, quand l'hydrolyse du même aminopolyholoside est totale, les groupes acétyles sont complètement éliminés des molécules d'N-acétylglucosamine ; la formation de l'anneau hétérocyclique ne peut plus se produire et aucune coloration ne se développe en présence du réactif d'Ehrlich.

Par contre la glucosamine est alors facilement décelable par sa réaction : condensée avec l'acétylacétone elle donne un dérivé du pyrrol qui fournit une coloration rouge avec le réactif d'Ehrlich.

2° ***Propriétés physiques.*** — Le chlorhydrate de glucosamine est une poudre cristalline très soluble dans l'eau. Son pouvoir rotatoire en solution aqueuse est droit $[\alpha]_D = +72°$, quand la mutarotation est terminée.

3° ***Propriétés chimiques.*** — La glucosamine donne la même osazone que le glucose et réduit la liqueur de Fehling. Son oxydation a été particulièrement étudiée soit en milieu neutre ou acide et en milieu alcalin. Cet aminoglucide offre une multitude de possibilités réactionnelles.

a) *Oxydation en milieu neutre ou acide.* — L'oxydation par le brome (Fischer [**25**]) et l'oxyde de mercure (Rushmann, Pringstien [**61**]) entraîne la formation d'acide glucosaminique :



en assez grandes proportions. Mais d'autres produits se forment en même temps. Ce sont des corps réduisant la liqueur de Fehling ou donnant la réaction à la naphtorésorcine chlorhydrique (Tollens). Von Euler et Klussmann [22] ont obtenu également des corps réduisant le dichlorophénol indophénol et le permanganate en milieu acide. On a pensé à la formation de corps voisins de l'acide ascorbique.

b) *Oxydation en milieu alcalin.* — En milieu alcalin, l'oxydation de la glucosamine est différente. Langheld [42], Goldschmidt [31], Herbst [35] avaient déjà observé que l'oxydation des acides aminés par les halogènes en milieu alcalin, conduit à l'obtention de l'aldéhyde ou du nitrile correspondant, suivant la quantité d'oxydant mise en œuvre. Herbst a étudié l'oxydation de l'acide glucosaminique et de la glucosamine par la chloramine T en milieu alcalin. Ces résultats sont résumés dans le schéma de la réaction suivante :

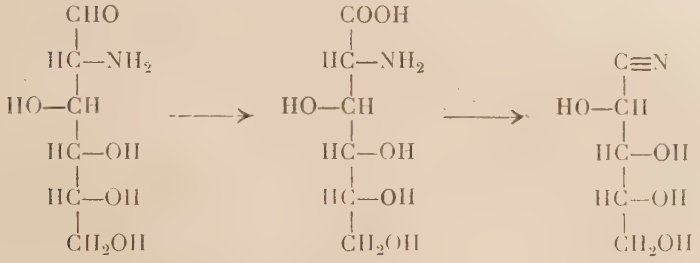
glucosamine ⟶ acide glucosaminique ⟨ arabinose / nitrile de l'érythrose + HCN (érythrosecyandrine)

C. Dumazert et H. Lehr [14 ; 15] ont été amenés à étudier l'oxydation de cette hexosamine par l'iode en milieu alcalin. Ces auteurs ont voulu appliquer à la glucosamine le microdosage iodométrique des aldoses de Bougault, modifié par C. Dumazert [13], basé sur la réaction :

$$R-CHO + 2\,I + H_2O = R-COOH + 2\,IH$$

Or ils constatent comme l'avait déjà fait Myrbaek qu'une molécule de glucosamine exige beaucoup plus de deux atomes d'iode. Une étude systématique leur a montré qu'une molécule de glucosamine réclame six atomes d'iode pour être complètement oxydée en milieu alcalin dans les conditions du dosage. Au cours de cette oxydation ils n'ont pas pu mettre en évidence la formation d'ammoniaque ce qui exclut la possibilité d'une réaction de désamination. De plus les dosages d'acide carbonique

se sont montrés en accord avec une décarboxylation. Les auteurs ont pensé que la glucosamine serait d'abord oxydée en acide glucosaminique. Ce dernier se comporterait ensuite comme un acide aminé et, en présence du large excès d'hypoiodite mis en œuvre, il réagirait en donnant naissance à un nitrile (cyanhydrine de l'érythrose), après être passé successivement par les stades d'acide di-iodo-amine, d'acide iodo-iminé, et, après décarboxylation, d'iodo-imine. Ils ont proposé le schéma suivant :



dont l'équation globale est :

$$C_6H_{11}O_5NH_2 + 6\ I + H_2O = C_5H_9O_4CN + CO_2 + 6\ HI$$

Ces réactions mettent bien en évidence qu'une molécule de glucosamine exige six atomes d'iode pour son oxydation complète et elles sont conformes aux résultats expérimentaux.

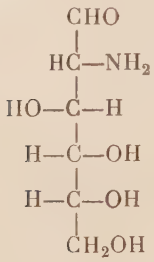
4° ***Réactions analytiques.*** — Les principales réactions caractéristiques de la glucosamine sont les suivantes :

α) L'oxydation de la glucosamine suivie de la désamination en acide nor-isosaccharique et la combinaison de celui-ci avec la cinchonine (Neuberg et Wolff).

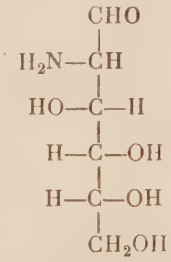
β) La formation d'esterbenzoïque à partir de la glucosamine.

γ) La glucosamine se condense avec l'acétylacétone en milieu alcalin et donne un dérivé pyrrolique qui fournit une coloration rouge avec le réactif d'Erlich en solution alcoolo-chlorhydrique. Plusieurs méthodes de dosage ont été basées sur cette réaction.

5° ***Structure.*** — La formule de la glucosamine peut aussi bien être présentée sous forme gluconique que mannonique. LEVENE admet qu'elle serait un amino-mannose.

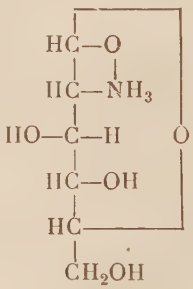


Glucosamine
(forme gluconique)



Glucosamine
(forme mannonique)

C. DUMAZERT et H. LEHR ont pensé, pour expliquer la complexité de l'oxydation de la glucosamine, pouvoir invoquer l'existence de cet amino-glucide sous la forme bétaïnique proposée par IRVINE et HYND [**41**].



Forme bétaïnique

Cette structure bétaïnique encore que très discutée, expliquerait plusieurs réactions anormales de la glucosamine et de l'épichitosamine à savoir : la difficulté d'hydrolyser par voie acide le méthylglycoside de la glucosamine (IRVINE et HYND), la résistance à la désamination par l'acide nitreux de la glucosamine-base (HYND et MAC FARLANE [**40**]), l'absence de mutarotation et l'impossibilité d'oxyder l'épichitosamine en son acide aldonique correspondant (LEVENE).

Harwoth, Peat et Wiggins apportent les preuves que la glucosamine est un dérivé du glucose et non du mannose. Peat et Wiggins avaient montré que l'ouverture d'un anhydrosucre par les alcalis, donne toujours naissance à 2 isomères. Lorsqu'on emploie l'ammoniaque, on a bien formation de 2 amino-sucres isomères, mais celle-ci s'accompagne d'une inversion de Walden sur le carbone porteur de la fonction aminée. S'appuyant sur ces résultats, ces auteurs tentent de réaliser une nouvelle synthèse de la glucosamine en traitant par l'ammoniaque le 2-3 aminomannoside. Comme dans les cas précédemment observés, il se forme 2 isomères et la réaction est accompagnée d'une inversion de Walden. Ils obtiennent le 2 amino-glucoside à côté du 3 amino-altroside, ce qui prouve que la glucosamine dérive du glucose.

Ils vérifient de nouveau ce fait par une autre voie : l'estérification des sucres par le chlorure de paratoluènesulfonyle donne des dérivés tosylés présentant des réactions intéressantes. Parmi celles-ci, le remplacement du groupe tosylé par la fonction aminée en passant par les anhydrosucres, se fait avec inversion de Walden. Cutler et Peat [12] réalisent ce remplacement dans des conditions telles, que la formation d'un anhydrosucre et par suite l'inversion de Walden ne puissent avoir lieu. Dans ce but, ces auteurs laissent réagir l'ammoniaque sur le 2-tosylglucose complètement méthylé (2-tosyl 3-4-6 triméthyl-méthylglucoside). Ce corps fournit le 2-amino 3-4-6 triméthyl-méthylglucoside, qui est en effet identique au méthyl-glucoside de la triméthyl glucosamine.

6° ***Rôle de la glucosamine.*** — Au cours du bref historique du sucre protéidique total, la présence de la glucosamine a été signalée dans la majorité des groupements prosthétiques glucidiques. Son rôle peut paraître étroitement lié à celui du sucre protéidique total. Cependant elle réagit souvent indépendamment des autres glucides qui l'accompagnent et d'une façon bien spécifique. Dans la chitine, par exemple, où elle est le seul constituant,

ce sucre aminé joue simplement un rôle plastique. Mais sa fonction est habituellement beaucoup plus complexe ; la diversité de sa répartition est sans doute une des causes de la variété des travaux dont elle a été l'objet. Nous les classons en recherches d'ordre biologique, physiologique et pathologique.

a) La glucosamine ne se trouve dans le sang que dans la fraction fortement combinée du sucre protéidique. Suivant les méthodes de dosage employées, les biologistes ont trouvé des taux différents. Bierry [6] détermine des valeurs assez peu constantes et généralement faibles. West, Clark et Kennedy [73] ont trouvé des valeurs oscillant chez l'individu normal entre 0,76 et 1,10 g. p. 1.000.

Au cours de son étude biologique on a déterminé à plusieurs reprises que la glucosamine n'est pas fermentescible sous l'action de la levure.

Mitzimana Imaizumi [53] a étudié la décomposition de l'acide glucosaminique et de la glucosamine par les microorganismes et les organismes supérieurs, mais il apporte peu de précision. Il constate que l'acide glucosaminique et la *d*.glucosamine donnent en présence du *B. coli* de l'acide lactique et succinique. Au cours de ses travaux, Mme Lutwack Mann [49] n'a pas pu mettre en évidence la formation de l'acide lactique dans la dégradation de la glucosamine par les bactéries. L'auteur japonais cité ci-dessus effectue des expériences sur le lapin et le chien. Il note la présence dans les urines, de divers acides organiques mais il mentionne qu'il n'a pas pu isoler aucun acide aminé. Ceci n'a rien de surprenant, car s'il s'en est formé, ils ont été dégradés selon les modes classiques d'utilisation des acides aminés.

Une étude biologique intéressante est celle de Mme Lutwack Mann sur le comportement des sucres aminés sous l'action enzymatique des tissus animaux, des levures et des bactéries. Des coupes de tissus mises en suspension dans une solution de glucosamine (ClH) entraînent invariablement une augmentation de l'oxygène absorbé et

une libération d'ammoniaque. L'absorption d'oxygène précède le dégagement d'ammoniaque. Les réactions se font plus rapidement avec la glucosamine qu'avec la chondrosamine et l'acétylglucosamine. La présence du radical acétylé de la N-acétyl-glucosamine est un obstacle à la désamination mais gêne peu l'oxydation. Les faits sont observés avec des coupes des parties corticales du rein, des testicules, du cerveau ; une faible activité est notée avec les ovaires, la rétine. Elle mentionne des résultats négatifs avec le foie, les muscles, la muqueuse intestinale, la rate, les globules sanguins, le plasma, le liquide synovial. Nous discuterons, dans la 2e partie de notre travail, le cas du muscle.

La désamination est aérobie avec les tissus animaux tandis que l'action enzymatique des bactéries se manifeste aussi bien en milieu aérobie qu'anaérobie. Mme Lutwack Mann n'a observé aucune mise en liberté de gaz carbonique au cours de la réaction et elle n'a pas pu mettre en évidence la formation d'acide glucosaminique bien qu'ayant mis en œuvre des méthodes diverses et parmi celles-ci la réaction caractéristique de l'acide glucosaminique de Cohen [9]. Mme Lutwack Mann a encore établi que l'enzyme examiné est spécifique des sucres aminés et n'a aucune relation avec la glucose-oxydase ou les acides amino-oxydases et les amino-oxydases. Son activité dépendrait de la structure cellulaire. Le pH optimum d'action se situe entre 7,4 et 7,8.

Parmi les produits de dégradation elle n'a trouvé ni acide lactique, ni acide acétique, ni acide succinique, pas plus que de corps aldéhydiques ou cétoniques.

L'acide iodacétique, les antiseptiques inhibent l'activité enzymatique, KCN et la glycéraldéhyde ont une action plus marquée sur l'oxydation que sur la désamination. Les sucres et le glucose en particulier diminueraient considérablement la désamination et entraîneraient l'oxydation.

Des expériences faites sur l'animal (des rats blancs) il ressort que des quantités considérables de sucre

aminé peuvent être injectées sans entraîner aucun changement net dans l'excrétion de l'azote ammoniacal. La dégradation du sucre aminé, chez l'animal intact, serait différente de celle observée par les tissus isolés.

Dans une autre série d'expériences, l'effet de la glucosamine a été recherché sur des rats carencés en vitamines B_2. Ici aucun résultat net n'a été noté.

Un système enzymatique provoquant l'oxydation et la désamination de la glucosamine et de la chondrosamine (ClH) a été signalé également dans le venin de l'abeille. (« Lyovac » Mulford Laboratories).

b) Au cours d'expériences de perfusions du rein, Hamburger et Brinkmann ont montré que la membrane du glomérule laisse passer partiellement la *d*-glucosamine.

Administrée *per os*, elle a une action sur les crampes insuliniques, alors qu'elle ne les fait pas cesser lorsqu'elle est donnée en injection sous-cutanée. Des auteurs japonais ont observé de l'hyperglycémie chez des animaux à qui ils administrent de fortes doses de glucosamine ; mais il n'est pas possible de préciser si ce fait traduit simplement la résorption de l'aminoglucide ou sa transformation en glucose.

H. M. Evans, H. Frankel [23] pensent pouvoir évaluer l'activité des hormones gonadotropes de l'hypophyse par leur taux en sucre et en glucosamine. Ils observent que la purification augmente l'activité hormonale et la teneur en hydrate de carbone et ils supposent que l'activité physiologique est liée à la présence de ces corps. H. M. Evans considère même que l'action des hormones gonadotropes est fonction de leur teneur en glucosamine.

c) Dans les cas pathologiques on ne possède encore que de vagues notions sur les relations entre les variations du taux de la glucosamine et les affections considérées.

Bierry [6] a étudié les variations quantitatives et qualitatives du sucre protéidique total dans le diabète. On a vu que les variations du sucre protéidique total sont irré-

gulières mais dans l'ensemble son taux est plus élevé que chez l'individu normal. On ne peut encore tirer aucune conclusion du taux de la glucosamine dont les variations paraissent assez anarchiques.

Le même auteur a étudié également l'action de l'injection d'extrait de rate combiné à l'ingestion de glucose chez ces mêmes malades. Là encore, on observe des variations du taux de la glucosamine, mais elles ne se font pas toujours dans le même sens.

A la suite d'une intéressante étude sur les malades atteints de néphrite, Bierry [6] constate que « dans le complexe glucidique, il peut se produire une modification sélective du groupe mannose-galactose d'une part, de la *d*-glucosamine d'autre part ». La *d*-glucosamine paraît moins « labile » ; c'est à elle surtout que paraît réservé le rôle « plastique » au sens physiologique » (*loc. cit.*, Bierry [6]).

Des études ont été également poursuivies par West, Clark et Kennedy [73] et ont porté sur 180 sérums. Ils ont fait les observations suivantes :

1°) Ils ne notent aucune relation entre la concentration en protéines et le taux de la glucosamine.

2°) Le taux normal de la glucosamine chez l'adulte varie entre 76 mg. et 110 mg. pour 100 cm^3 de sérum.

3°) Une élévation de ce taux est observée dans les infections, les affections malignes et chez les sujets porteurs d'infractus stériles.

4°) Ce taux est beaucoup plus bas chez le nouveau-né.

Cette rapide énumération des études faites sur la glucosamine montre la multitude et la complexité de ses réactions chimiques et biologiques. Ceci découle sans doute de sa structure elle-même où fonction glucidique et aminée sont étroitement liées ; chacune d'elles possède toute une série de caractères spécifiques qui se manifesteront normalement ou bien modifiées par la présence de l'autre. L'intérêt de l'étude de la glucosamine est accru par la diversité de sa répartition et l'importance des

groupements prosthétiques glucidiques qui apparaît de plus en plus grande, en biologie et en immunochimie.

C. — *LE SUCRE FAIBLEMENT COMBINÉ.*

Propriétés et nature. — Nous avons vu plus haut comment C. Dumazert et Penet ont été amenés à distinguer dans le sang, une fraction glucidique combinée, libérable par hydrolyse faible (acétolyse). Ils ont établi qu'elle est absolument distincte d'une 2e fraction fortement combinée aux protéines et libérable seulement par une hydrolyse sulfurique.

Ces mêmes auteurs ont montré que cette fraction est fermentescible et nous rappelons que Thivolle et Fontès avaient fait la même observation au sujet du glucide X.

C. Dumazert et Penet [19] ont, d'autre part, remarqué que le sucre faiblement combiné participe à la glycolyse sanguine : il disparaît parallèlement au sucre libre.

Les récents travaux de C. Dumazert et Lévy (inédit) apportent d'intéressantes précisions sur la nature de cette fraction glucidique ; ils ont repris les travaux d'auteurs allemands qui avaient observé que la phénanthroline freine la glycolyse du sucre libre, au début de ce phénomène. C. Dumazert et M. Lévy (1) ont vérifié ce résultat et ont cherché en même temps à mettre en évidence si la glycolyse du sucre faiblement combiné est également modifiée par la phénanthroline. Ces auteurs ont pu établir que :

1)° La phénanthroline freine au début la glycolyse du sucre libre puisque, entre 15 min. et 1 h. 30 il y a arrêt de la disparition de celui-ci. Après ce temps de latence, le glucose libre diminue graduellement et disparaît complètement après 8 heures.

2°) Pendant la période au cours de laquelle la glycolyse est arrêtée, le sucre faiblement combiné présente

(1) Inédit.

une augmentation très nette. Il disparaît ensuite lorsque la glycolyse du sucre libre reprend.

C. Dumazert et M. Lévy ont alors étudié le comportement du phosphore inorganique dans les mêmes conditions expérimentales que précédemmeant, ils ont constaté que ces variations se font exactement en sens inverse de celles du sucre faiblement combiné, c'est-à-dire qu'il présente une diminution entre 15 minutes et 1 h. 30. Il reprend ensuite sa valeur initiale.

Ces expériences montrent donc les rôles respectifs du phosphore et du sucre faiblement combiné au cours de la glycolyse en présence de phénanthroline. Le parallélisme de ces deux phénomènes permet de présumer qu'une combinaison phosphorique participe à la glycolyse sanguine (H. Bierry ; A. et J. Roche [64]). D'autres expériences viennent à l'appui de cette hypothèse. En effet, C. Dumazert et M. Lévy ont étudié les variations du phosphore combiné au cours de la glycolyse et ils ont observé qu'il augmente d'une façon concomittante au sucre faiblement combiné. Une étude plus poussée du phénomène montre un arrêt de la formation de l'acide lactique entre 15 minutes et 1 h. 30.

Vérifiant l'action de la phénanthroline sur les phosphatases des globules sanguins, ces auteurs ont pu constater qu'elles présentent le maximum d'activité pour les quantités de phénanthroline employées dans les expériences précédentes.

Des expériences préliminaires avaient permis de constater que d'une part, l'hydrate de cadmium employé comme déprotéinisant retient le sucre faiblement combiné ; par contre, l'acide trichloracétique ou l'alcool, en milieu acide, laisse passer le sucre faiblement combiné dans le filtrat de déprotéinisation. Ceci permet de tirer les conclusions suivantes sur la nature de ce sucre : s'il existe une liaison entre le sucre faiblement combiné et les protéines du sang, celle-ci est très labile, puisqu'il suffit d'opérer la déprotéinisation à froid en milieu acide pour libérer ces fractions glucidiques.

C. Dumazert et M. Lévy se sont appuyés sur ces observations pour entreprendre l'isolement des corps résultant de l'hydrolyse des sucres faiblement combinés. Ils ont fait tout d'abord une déprotéinisation cadmique, le sucre libre reste ainsi en solution et est éliminé par lavage du précipité protéique. Ils ont alors dissout les protéines dans l'acide acétique. En les précipitant à nouveau par l'acide trichloracétique, le sucre faiblement combiné passe en solution. Après hydrolyse acide, le sucre est absorbé par l'hydrate de cuivre et la chaux puis élué en milieu acide. Enfin, la liqueur est soumise à l'action de la phénylhydrazine. Il n'a été observé aucune précipitation à froid. A la suite d'un chauffage au bain-marie pendant 30 minutes, un précipité est apparu ; il a été isolé, lavé et purifié par recristallisations successives. Son étude a montré qu'il s'agissait de la glucosazone.

2° ***Rôle physiologique du sucre faiblement combiné.*** — Les premiers résultats expérimentaux sur le rôle physiologique du sucre faiblement combiné nous sont donnés par J. Roche et C. Dumazert [**65**] au sujet d'une étude consacrée aux glucides de l'hémolymphe de *Cancer Pagarus*.

Après avoir montré l'existence d'une glycémie libre chez ce crustacé et en avoir déterminé la valeur, ils ont étudié les facteurs de variations du taux des glucides libres et combinés. Ils ont constaté qu'il existe chez *Cancer Pagarus* un système glycorégulateur différent de celui des mammifères supérieurs par le fait qu'il n'obéit pas aux hormones glycorégulatrices de ce dernier. Par contre, l'asphyxie, c'est-à-dire le séjour des animaux hors de l'eau provoque une hyperglycémie. Celle-ci s'abaisse après être restée constante quelques heures. Un fait retient notre attention : la fraction glucidique libérée par acétolyse suit pendant ce temps des variations inverses. Son taux décroît lorsque l'hyperglycémie se manifeste. Ces auteurs ont conclu en assimilant le rôle du sucre faiblement combiné « à celui d'une réserve immé-

diatement utilisable aux dépens de laquelle l'hyperglycémie prendrait naissance ».

A la suite de ces travaux, C. Dumazert et Memmi ont étudié le comportement de cette fraction sous l'action de l'adrénaline et de l'insuline *in vivo*. Les expériences ont été pratiquées sur le Lapin et le Chien. Comme dans les expériences précédentes, le dosage de la glycémie libre est déterminé par la méthode Hagedorn-Jensen, celui du sucre faiblement combiné selon la technique mise au point par C. Dumazert et G. Penet.

Les observations suivantes ont été faites :

1°) Lorsque, sous l'action de l'adrénaline, la glycémie libre s'élève, le taux du sucre faiblement combiné diminue.

2°) Inversement, ils ont noté que sous l'action de l'insuline, le sucre faiblement combiné varie exactement en sens inverse. Quand le premier diminue, le second s'élève.

Les résultats des travaux que nous venons de résumer, mettent en évidence d'une façon définitive, l'existence dans le sang d'une fraction glucidique faiblement combinée.

L'étude sur la glycolyse laisse supposer que ce sucre est combiné à un groupement phosphorique.

La comparaison du taux de la glycémie libre avec celui du sucre faiblement combiné, aussi bien au cours des expériences effectuées *in vitro*, qu'*in vivo*, montre le rôle du sucre faiblement combiné dans le métabolisme intermédiaire des glucides. Il apparaît comme étant une des premières étapes de transformation du glucose à l'état de combinaison assez labile, pour être à la disposition de l'organisme, chaque fois que la glycémie subit des variations, quels qu'en soient les facteurs.

III. — OBJET DU TRAVAIL.

Le but essentiel de notre travail a été d'étudier la dégradation biologique et chimique de la glucosamine, constituant du sucre combiné du sang. A cette occasion, nous avons été amenés à rechercher si le dosage colorimétrique de la glucosamine était susceptible de perfectionnements. Nous exposons les résultats de ce travail dans une première partie.

Par ailleurs, nous avons poursuivi des recherches relatives aux glucides combinés du sang. Nous avons appliqué la technique que nous proposons pour le dosage de la glucosamine à la détermination du taux de ce sucre aminé dans le sérum sanguin.

Enfin, à la suite des travaux effectués par C. Dumazert et Memmi sur les variations du sucre faiblement combiné sous l'action de l'adrénaline et de l'insuline *in vivo*, nous nous sommes proposés d'étudier cette fraction glucidique chez le diabétique traité par l'insuline et chez le diabétique non traité.

RECHERCHES PERSONNELLES.

PREMIÈRE PARTIE.

Sur la biochimie de la glucosamine.

I. — DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE LA GLUCOSAMINE.

Avant d'entreprendre une étude sur la glucosamine, nous avons cherché à apporter des modifications à son dosage colorimétrique qui ne nous avait pas paru très satisfaisant. Antérieurement à ce travail plusieurs techniques ont été données par différents auteurs, ce qui montre que la mise au point de ce dosage doit présenter quelques difficultés.

Voyons tout d'abord, rapidement, les méthodes proposées jusqu'à ce jour.

A. — *EXPOSÉ DES MÉTHODES ANTÉRIEURES.*

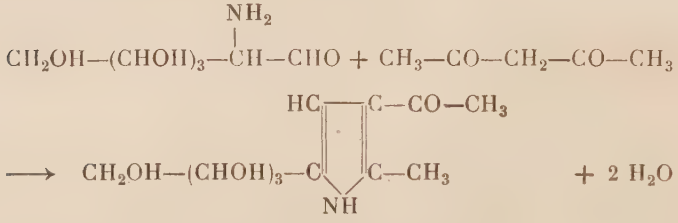
La détermination de la glucosamine peut se faire sous forme de benzoate ou d'isocyanate (Stendal) mais ce sont là des macrométhodes.

Entre 1922 et 1938, plusieurs techniques ont été proposées pour le dosage colorimétrique de l'acétyl-glucosamine à l'échelle micro-analytique, et basées sur la réaction signalée par Muller en 1901 : coloration rouge donnée par l'acétyl-glucosamine avec le réactif d'Ehrlich (paradiméthylaminobenzaldéhyde).

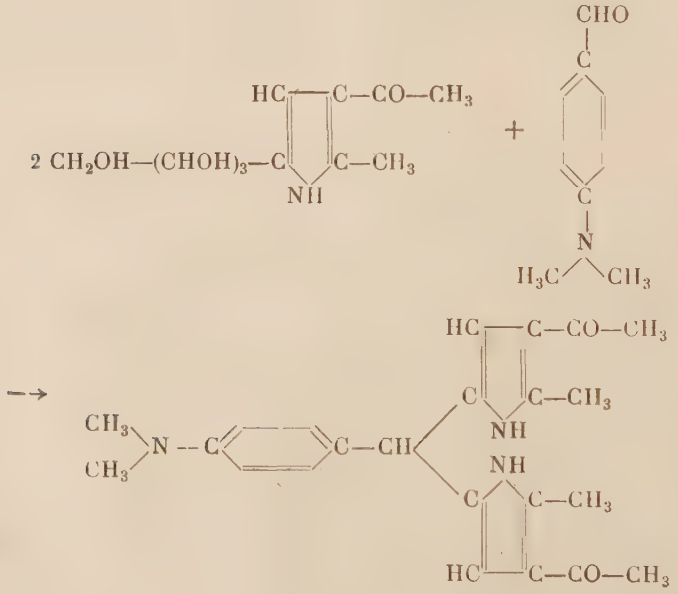
La première méthode est donnée par Pauly et Ludwig [57]. Zuckerkland, Messner, Klebermass [76] proposent l'acétate d'argent en solution acétique comme agent

d'acétylation de la glucosamine. En 1933, Elson et Morgan [21] introduisent l'acétylacétone dans le dosage. Il se fait en deux temps : 1° condensation à chaud de l'acétylacétone avec la glucosamine en solution carbonatée ; 2° condensation à froid du dérivé précédent avec le réactif d'Ehrlich. Cette méthode n'est utilisable qu'entre 0,750 mg. et 3 mg.

Boyer et Furth [8] ont montré que la glucosamine, en se condensant avec l'acétylacétone, donne un dérivé pyrrolique suivant l'équation :



Puis deux molécules de ce corps réagissent avec une molécule de paradiméthylaminobenzaldéhyde



Ces mêmes auteurs prétendent que les acides aminés ou les protéines isolées, quand ils coexistent en concentration supérieure à celle de la glucosamine, diminuent l'intensité de la coloration. Mais M. Sörensen [68] a montré que pour de faibles quantités de glucosamine(de l'ordre de 100 γ) les dosages ne sont nullement troublés par la présence de ces corps. Après Nilsson, M. Sörensen modifie encore la technique de Morgan et discute particulièrement les conditions dans lesquelles ces auteurs font la condensation de l'acétylacétone avec la glucosamine. Elle met en évidence l'importance du pH au cours de cette réaction. Après une étude systématique, elle détermine que le pH optimum est 9,5 et qu'il est obtenu en utilisant une solution de 0,5 cm³ d'acétylacétone dans 25 cm³ de CO_3Na_2 N/2.

Cependant, au cours d'études faites sur la glucosamine, cette technique n'a pas présenté une grande fidélité ; aussi avons-nous été amenés à la modifier. M. Sörensen ayant montré l'importance du pH dans la condensation de la glucosamine avec l'acétylacétone, nous avons pensé faire porter les modifications sur le réactif alcalin dans lequel l'acétylacétone est dissoute. Puis nous avons étudié les conditions optima du dosage en fonction des quantités d'acétylacétone mises en jeu, de la durée du chauffage à 100° C. de l'acétylacétone avec la glucosamine et enfin le temps nécessaire au développement maximum de la coloration après addition du réactif d'Ehrlich.

B. — *REMPLACEMENT DE LA SOLUTION DE CO_3Na_2 N/2 PAR UNE SOLUTION TAMPON DE PHOSPHATES.*

Nous avons remplacé le réactif carbonaté par un réactif phosphaté de composition suivante :

Phosphate disodique I2 H_2O....	35,8	g.
NaOH N	80	cm³
Eau distillée q. s.....	200	cm³

Voici les conditions du dosage : A 2 cm³ d'une solution de glucosamine (ClH), on ajoute 2 cm³ de réactif

phosphaté et 0,05 cm³ d'acétylacétone. On chauffe au bain marie bouillant 20 minutes. Après refroidissement on ajoute 10 cm³ d'alcool et 2 cm³ de réactif d'EHRLICH. On attend 30 minutes avant de faire des lectures. Nous avons comparé les résultats obtenus dans ces conditions avec ceux trouvés en employant la méthode de M. SÖRENSEN. Les lectures ont été faites à la cellule photoélectrique. Voici les résultats obtenus :

	Extinctions exprimées en mmvolt	
Mg. de glucosamine	Réactif carbonaté	Réactif phosphaté
—	—	—
3 mg.	62	28
0,300	81	70
0,050	96	91

On obtient donc, en milieu phosphaté, dans les conditions précédentes, une coloration beaucoup plus intense avec le réactif phosphaté qu'avec le réactif carbonaté, préconisé par M. SÖRENSEN pour une quantité de glucosamine déterminée.

1° ***Etude du dosage en fonction de la durée du chauffage à 100° C. de la glucosamine (ClH) avec l'acétylacétone.*** — On a alors étudié l'influence du temps de chauffage au bain marie bouillant nécessaire à la condensation de la glucosamine avec l'acétylacétone en employant 0,05 cm³ de ce dernier réactif. Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant :

TABLEAU I. — *Etude du dosage colorimétrique de la glucosamine (ClH) en fonction de la durée du chauffage à 100° de la glucosamine avec 0,05 cm³ d'acétylacétone.*

γ de glucosamine (ClH)	Temps de chauffage au bain-marie bouillant				
	10'	20'			40'
320	43	90	86	86	96
240	34	62	62	63	66
160	24	46	43	42	44
80	12	22	18	17	16
40		5	7	7	

Il ressort de ce tableau que le chauffage au bain-marie bouillant doit être maintenu au moins 20 minutes.

On a fait ensuite la même étude que précédemment, mais en utilisant 0,1 cm³ d'acétylacétone.

TABLEAU II. — *Etude du dosage colorimétrique de la glucosamine (ClH) en fonction de la durée du chauffage au bain marie bouillant de la glucosamine avec 0,1 cm³ d'acétylacétone.*

γ de glucosamine (ClH)	Temps de chauffage au bain-marie bouillant (en minutes) Extinctions						
	20'			30'		50'	90'
320	167	167	166	178	178	175	138
240	133	132	132	144	144	147	112
160	102	102	101	108	109	104	82
80	54	55	55	61	61	62	39

Nous voyons d'après les résultats mentionnés dans les tableaux I et II que l'on a avantage à utiliser 0,1 cm³ d'acétylacétone ; de plus le chauffage au bain-marie bouillant de ce réactif avec la glucosamine doit être maintenu 30 minutes pour que la condensation soit complète ; cependant un chauffage trop prolongé donne des résultats par défaut.

2° ***Détermination du temps nécessaire au développement maximum de la coloration.*** — Nous avons fait des dosages en effectuant la condensation de l'acétylacétone avec la glucosamine dans les conditions que nous venons de préciser, en vue de déterminer le temps nécessaire au développement maximum de la coloration.

TABLEAU III. — *Détermination du développement maximum de la coloration en fonction du temps.*

γ de glucosamine (ClH)	Temps de développement de la coloration Extinctions		
	15'	30'	60'
320	178	178 178	165
240	144	144 144	135
160	109	108 108	104
80	60	61 61	55

Les résultats de ce tableau montrent que les lectures doivent être faites au photomètre 15 à 30 minutes après addition du réactif d'Ehrlich.

C. — *TECHNIQUE PROPOSÉE.*

Voici la technique que nous avons adoptée :

Réactifs : Acétylacétone.
Réactif phosphaté signalé plus haut.

Réactif d'Ehrlich :
- Paradiméthylaminobenzaldéhyde. 0,80 g.
- Alcool à 95° ..... 30 cm³
- HCl concentré pur ..... 30 cm³

M. O. : Dans un tube à essai on met 2 cm³ d'une solution de glucosamine (renfermant 25 γ à 300 γ) et on ajoute 2 cm³ de réactif phosphaté et 0,1 cm³ d'acétylacétone. On agite vigoureusement jusqu'à dissolution complète de l'acétylacétone. Les tubes sont bouchés avec un bouchon entaillé selon une génératrice et placés au bain-marie bouillant 30 min. Après refroidissement on ajoute 10 cm³ d'alcool à 95° et aussitôt après 2 cm³ de réactif d'Ehrlich. On agite et on colorimètre au photomètre de Pulfrich après 15 à 30 minutes, avec un témoin préparé dans les mêmes conditions, 2 cm³ d'eau remplaçant les 2 cm³ de glucosamine. (Cuve de 30 m/m. — Filtre vert S-50). Se reporter à la courbe étalon.

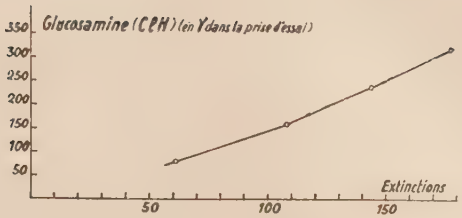


FIGURE 1. — *Courbe étalon du dosage de la glucosamine (ClH).*

NOTES. — 1°) La prise d'essai ne doit pas dépasser 2 cm³.

2°) Après addition de l'alcool, il se forme un trouble provoqué par la précipitation du phosphate de soude, mais ce dernier se redissout très rapidement et complètement par l'addition immédiate du réactif d'EHRLICH et agitation.

3°) Une coloration rose peut apparaître également dans l'essai témoin lorsque l'acétylacétone n'est pas pure, dans ce cas il faut la redistiller (température E : 135°).

4°) On a intérêt à tracer une nouvelle courbe étalon chaque fois qu'on renouvelle un des réactifs. Dans ces conditions, les dosages présentent une fidélité très satisfaisante.

5°) En comparant notre courbe étalon avec celle donnée par M. SÖRENSEN [68] nous voyons que toutes deux présentent des pentes très voisines. Cependant les dosages des mêmes quantités de glucosamine par la méthode de M. SÖRENSEN et par notre technique nous ont toujours donné des extinctions beaucoup plus faibles avec la méthode de M. SÖRENSEN qu'avec la nôtre. Ces deux méthodes seraient donc presque équivalentes au point de vue de la sensibilité ; par contre, nous apportons une amélioration nette à la fidélité du dosage, qualité importante, quand on veut appliquer une technique à des études comparatives.

Une fois en possession de cette technique, nous avons cherché à l'appliquer à la détermination de la glucosa-

mine du sucre protéidique du sérum sanguin ; nous donnons les résultats de ces recherches dans la partie consacrée aux glucides combinés du plasma sanguin.

II. — ÉTUDE DE LA DÉCOMPOSITION BIOLOGIQUE DE LA GLUCOSAMINE.

A. — *DÉGRADATION ENZYMATIQUE.*

1° ***Par les tissus.*** — Les réactions qui se passent dans les cellules, sont rendues possibles, dans les conditions où elle se font, grâce à la présence de puissants catalyseurs : les enzymes. Il a paru intéressant de chercher s'il existe dans les tissus animaux, un système enzymatique capable de permettre la décomposition de la glucosamine qui se trouve dans l'organisme sous forme acétylée. Lorsque nous avons entrepris cette étude nous n'avions pas connaissance des travaux effectués par Mme Lutwack-Mamm (1941) [**49**] en sorte que nos recherches ont été poursuivies indépendamment de celles de cet auteur.

Nous avons étudié deux phénomènes, à savoir : la dégradation de la glucosamine, en tant que corps donnant la réaction d'Ehrlich et sa désamination.

a) Etude en fonction du pH et du temps.

Voici la technique que nous avons employée.

Nous avons habituellement utilisé les tisssu musculaires de rat blanc ; aussitôt après avoir sacrifié l'animal on prélève 5 à 6 g. de muscles que l'on broie en purée avec du sable lavé et 0,500 g. de chlorure de sodium. D'autre part on prépare une solution de glucosamine (ClH) à 0,100 g. pour 100 cm^3 environ à pH 7,4 dans un milieu tampon de phosphates ; c'est le pH optimum d'activité enzymatique ainsi qu'il résulte des essais qui seront exposés ci-après. On met la purée de muscle en

suspension dans cette solution à laquelle on ajoute quelques gouttes de chloroforme ; on fait un dosage initial par la méthode colorimétrique exposée plus haut. La macération bouchée est portée à l'étuve à 37°. Nous avons fait ensuite des dosages à intervalles réguliers et nous avons noté une légère diminution de la concentration en glucosamine après 14 h. 30 seulement. Voici les résultats :

TABLEAU IV. — *Pourcentage de glucosamine dégradée sous l'action du tissu musculaire en fonction du temps.*

Heures de macération	Quantités de glucosamine (en mg.) dégradées pour 100 mg.
14 h. 30	3,8 p. 100
15 h. 30	61,5 —
16 h. 30	93,5 —
17 h. 30	99,3

Nous traduisons ces résultats sur la courbe ci-dessous.

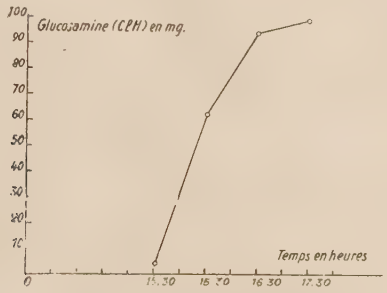


FIGURE 2. — *Quantités de glucosamine (C6H) dégradées sous l'action enzymatique des tissus musculaires en fonction du temps.*

L'examen de la courbe nous montre que pendant 14 h. environ la concentration en glucosamine reste constante, puis lorsque la dégradation a commencé, plus de 50 p. 100 de la glucosamine sont décomposés en 1 heure. Mais 2 heures environ après l'apparition de la décomposition,

celle-ci se fait beaucoup plus lentement. Des résultats analogues ont été obtenus plusieurs fois au cours d'expériences effectuées dans les mêmes conditions.

Ces résultats mettent en évidence, dans le tissu musculaire, un système enzymatique capable de décomposer la glucosamine (ClH). Ils montrent également que l'activité enzymatique ne se manifeste qu'après plusieurs heures de macération des tissus à 37°. A partir de ce moment la décomposition est rapide.

Au cours de nos expériences nous avons observé l'ininfluence du pH sur la vitesse de la dégradation de la glucosamine. Le maximum d'activité enzymatique se manifeste à pH 7,4. A pH 7,6 la vitesse à laquelle se produit la décomposition est plus réduite mais le ralentissement est plus accentué à pH 8.

b) En fonction de la duré de l'autolyse.

La période d'incubation qui précède la dégradation peut être interprétée en admettant que l'enzyme n'est libéré qu'après plusieurs heures d'autolyse. En vue de vérifier cette hypothèse nous avons fait les expériences suivantes : nous avons préparé des macérations de purées de muscle et de foie dans les mêmes conditions que précédemment mais :

a) deux d'entre elles sans glucosamine ;

b) deux autres en présence de glucosamine.

Un dosage initial est fait sur ces deux dernières ; nous les avons portées à l'étuve à 37° et après 16 heures, nous avons vérifié que la concentration en glucosamine de (*b*) avait bien varié. A ce moment nous avons mis la glucosamine en solution dans (*a*). Après détermination de sa concentration initiale nous avons replacé les macérations à l'étuve et fait des dosages après une 1/2 heure et 2 heures.

TABLEAU V. — *Activité enzymatique de macérations de purées de muscles et de foie sur la glucosamine (ClH) (exprimée en mg. de glucosamine dégradée pour 100 mg.).*

Glucosamine additionnée à des macérations	Muscles	Foie
I. — a) Fraîchement préparée.		
Après 16 h.	85,1	60
b) Ayant subi 16 h. d'autolyse.		
Après 1/2 heure	13,6	7,3
Après 2 heures	90,3	56,8
II. — a) Fraîchement préparée.		
Après 14 h. 30	68	
b) Ayant subi 14 h. 30 d'autolyse.		
Après 1 heure	75	

Ainsi, lorsque les macérations de tissus musculaires et de foie, ont été maintenus 14 h. environ à l'étuve à 37°, la dégradation de la glucosamine se manifeste dès la première heure qui suit son addition. On voit donc que l'activité de l'enzyme n'apparaît qu'après plusieurs heures d'autolyse et elle résulte de l'autolyse aseptique des tissus.

Nous avons observé également que dès qu'elle est déclenchée, la décomposition est rapide pendant les 90 premières minutes, puis elle se fait avec un rendement de plus en plus faible. Nous avons alors voulu vérifier si l'activité de l'enzyme diminue après avoir atteint un maximum. Dans ce but, nous avons fait les expériences suivantes :

Nous avons suivi la dégradation de la glucosamine dissoute d'une part dans une macération fraîche de muscles, et d'autre part additionnée à des macérations ayant subi des autolyses de 14 h. - 16 h. 30 - 19 h. 30. Si notre

hypothèse se vérifie, la dégradation doit se faire au-delà de 14 h. à une vitesse d'autant plus réduite que la macération est plus vieille. Nous donnons les résultats dans le tableau suivant :

TABLEAU VI. — *Activité enzymatique d'une macération de muscles en fonction de la durée de l'autolyse (mg. de glucosamine dégradée p. 100 mg.).*

	Heures de prélèvements après addition de la glucosamine (ClH)		
Addition de la glucosamine à une macération fraîche.	14 h. 10	15 h. 52,44	16 h. 91,08
Addition de la glucosamine après 14 h. d'autolyse.	1 h. 15 21,30	2 h. 15 56,80	5 h. 100
Addition de la glucosamine après 17 h. 30 d'autolyse.	2 h. 00 51,20	3 h. 30 89,60	
Addition de la glucosamine après 19 h. 30 d'autolyse.	1 h. 30 12,8	4 h. 29,44	

Les résultats sont traduits graphiquement par la figure 3.

Les courbes figurant la décomposition de la glucosamine en solution dans des macérations ayant subi des autolyses de plus en plus prolongées, montrent que l'activité de l'enzyme diminue après être passée par un maximum. Cette activité maxima se manifeste sur des macérations qui ont subi des autolyses de 14 à 16 h. environ. Avant 14 h. elle est nulle ou très faible, après 16 h. elle s'affaiblit et d'une façon particulièrement nette à partir de 20 h.

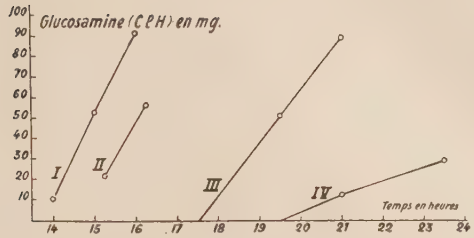


FIGURE 3. — *Evolution de l'activité enzymatique de macération de tissus musculaires sur la glucosamine (ClH) en fonction de leur durée d'autolyse préalable et du temps.*

Courbe I : Glucosamine additionnée à une macération fraîche.
Courbe II : Glucosamine additionnée à une macération ayant subi 14 h. d'autolyse.
Courbe III : Glucosamine additionnée à une macération ayant subi 17 h. d'autolyse.
Courbe IV : Glucosamine additionnée à une macération ayant subi 19 h. 30 d'autolyse.

c) Désamination enzymatique de la glucosamine.

Nous avons recherché si la décomposition de la glucosamine par les tissus musculaires se faisait par désamination ; nous nous sommes donc proposé de suivre la formation d'ammoniaque parallèlement avec la décomposition de sucre aminé. L'ammoniaque est dosée par la méthode de CRISMER dont voici la technique :

RÉACTIFS : 1°) Eau bidistillée. — Redistillation d'eau distillée additionnée de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré et pur. Elle sert à la préparation de toutes les solutions et au lavage de la verrerie.

— 2°) Solution de phénol. — Dans 50 cm³ de soude à 40 p. 100 parfaitement clarifiées par filtration au filtre SCHLEICHER et SCHÜLL 575 dissoudre 25 g. de phénol MERCK pour analyse. Diluer à 100 cm³.

— 3°) Solution de chloramine T à 5 p. 100. — Filtrer, vérifier sa transparence au photomètre ; elle doit présenter une transparence de 100 p. 100 par rapport à l'eau distillée.

— 4°) Solution saturée de carbonate potassique.

— 5°) Solution centinormale d'acide sulfurique.

Dosage. — Déplacement de l'ammoniaque. — (La méthode de Conway et Byrne [10] indique le maniement correct de l'unité et la durée de l'opération).

Dans le compartiment central de « l'unité de Conway » se trouve 1 cm³ d'acide sulfurique M/100 destiné à absorber l'ammoniac déplacé par le carbonate potassique. A la fin de l'opération, ce liquide absorbant est recueilli au moyen d'une pipette très effilée munie d'une tétine en caoutchouc. A deux reprises le compartiment d'absorption est lavé avec 0,5 cm³ d'eau bidistillée. L'eau de lavage est ajoutée au liquide qui se trouve déjà dans le tube à réaction. C'est sur ces 2 cm³ de liquide que porte le dosage. Au contenu du tube à réaction on ajoute 1 cm³ de solution de phénol ; on agite pour homogénéiser ; ajouter ensuite au moyen d'une burette 3 cm³ de la solution de chloramine. Homogénéiser le liquide avec un agitateur et recueillir les gouttelettes des réactifs restés accrochés le long des parois. Sur l'orifice du tube, on place un condensateur constitué par une petite ampoule de verre dont l'extrémité inférieure, effilée en cône, plonge à l'intérieur du tube. Cette ampoule est remplie d'eau. Placer les tubes au bain-marie bouillant 10 minutes, puis les refroidir pendant 5 minutes sous un courant d'eau froide ; lecture au photomètre de Pulfrich. On emploie le filtre S 61 ; cuvette 20 m/m. d'épaisseur.

Dans la cuvette de comparaison mettre le contenu du tube témoin : 2 cm³ d'eau bidistillée remplace le liquide recueilli dans l'unité Conway ainsi que l'eau de lavage.

Se rapporter à la courbe d'étalonnage établie au moyen d'une solution contenant des quantités connues d'ammoniaque (sulfate ou oxalate).

La lecture se fait aussitôt que possible ; toutefois il n'y a aucun inconvénient à retarder l'examen photométrique, condition qui se réalise pour les derniers tubes d'un titrage en série.

Si la coloration des tubes exposés à la lumière solaire varie de 5 p. 100 à l'heure, celle des tubes conservés à l'obscurité ne varie pas. La limite inférieure de dosage est 3 γ, le pourcentage d'erreur est inférieur à 1 p. 100.

Nous avons préparé une suspension de tissus musculaires dans les mêmes conditions que dans les expériences précédentes et nous avons additionné 20 mg. de glucosamine (ClH) pour 100 cm³ à cette macération fraîche. Sur celle-ci nous avons dosé simultanément la glucosamine et l'ammoniaque après des temps différents. D'autre part nous avons préparé une macération témoin, sans glucosamine sur laquelle nous avons fait des dosages d'ammoniaque au même moment que ceux de la macération précédente.

La différence entre les quantités d'azote ammoniacal dosées sur les deux macérations, à un temps déterminé, exprime la quantité d'azote ammoniacal dégagée aux dépens de la dégradation de la glucosamine.

Dans le tableau suivant nous indiquons les quantités de glucosamine dégradée et l'azote ammoniacal dégagé. Nous avons également calculé les quantités de glucosamine qui correspondent théoriquement à celles d'ammoniaque formées à partir du sucre aminé.

TABLEAU VII. — *Désamination de la glucosamine au cours de sa dégradation enzymatique.*

Heures d'autolyse	Glucosamine décomposée (en mg.)	Azote ammoniacal exprimé (en mg.)	Mg. de glucosamine correspondant théoriquement à l'azote ammoniacal dosé
15 h.	12		
16 h.	26	1,48	22,78
16 h. 30	—	1,90	29,24
17 h.	55	—	—
18 h.	70	4,34	66,8

Nous remarquons qu'il y a presque concordance entre les quantités de glucosamine dégradées et désaminées. La désamination paraît donc être totale au cours de la décomposition de cet amino glucide par le système enzymatique des tissus musculaires.

Nous résumerons les caractères de ce système enzymatique en rappelant qu'une autolyse de 14 heures environ est nécessaire à l'apparition de son activité. De plus celle-ci se manifeste pendant un temps très court ; elle diminue en effet dans de fortes proportions quand on met en œuvre des purées de muscles ayant autolysé au delà de 16 à 20 heures. Il paraît probable que des recherches plus approfondies sur le foie mettraient également en évidence un système enzymatique semblable dans cet organe.

2° ***Par les levures.*** — Nous avons étudié la décomposition de la glucosamine par la levure des boulangers.

a) Etude en fonction du pH et du temps.

6 g. de levure fraîche sont mis en suspension dans 50 cm³ d'eau distillée. 1 cm³ de cette suspension est ajouté à 11 cm³ d'une solution glucosamine à 20 mg. pour 100 dont le pH est 7,3 (en milieu tampon phosphaté). On bouche et on porte à l'étuve à 37°.

Après 5 h. seulement le dosage de la glucosamine montre que se sucre aminé a été complètement dégradé.

Nous avons déterminé le pH optimum d'activité.

TABLEAU VIII. — *Activité enzymatique de la levure sur la dégradation de la glucosamine (exprimée en mg. dégradés pour 100 mg.) en fonction du pH et du temps.*

pH	Durée d'autolyses			
	2 h. 30	3 h. 30	4 h. 45	6 h.
8	0	9,75	68,2	75,6
7,4	0	46,3	77,07	90,4
6,5	0	26,8	58,5	87,8
5,5	0	19,5	56,09	82,9

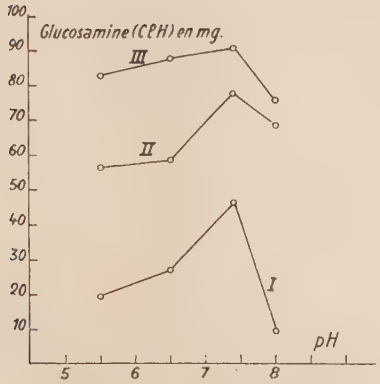


FIGURE 4. — *Activité enzymatique de la levure sur la dégradation de la glucosamide (ClH)* (exprimée en mg.) *en fonction du pH et du temps.*

Courbe 1 : Quantités de glucosamine dégradées après 3 h. 30 d'autolyse.

Courbe 2 : Quantités de glucosamine dégradées après 3 h. 45 d'autolyse.

Courbe 3 : Quantités de glucosamine dégradées après 6 h. d'autolyse.

L'examen de cette courbe nous montre que le pH optimum est 7,3 ; nous voyons de plus que le rendement est plus mauvais pour les pH alcalins que pour les pH acides.

b) ETUDE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN LEVURE.

Nous avons étudié la décomposition de la glucosamine en fonction de la concentration de la levure à pH 7,3.

15 g. de levure fraîche sont mis en suspension dans q. s. 100 cm³ d'eau distillée ; on distribue dans des tubes 10 cm³ de solution tampon phosphatée à pH 7,3 et 1 cm³ de solution de glucosamine. Dans un tube on met 1 cm³ de suspension de levure et dans les autres 1 cm³ des dilutions au $\frac{1}{8}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{1}{40}$ $\frac{1}{80}$ $\frac{1}{800}$. Les tubes sont placés dans l'étuve à 37° et on fait des prélèvements après 1 h., 2 h., 4 h., 6 h., 7 h. 30.

TABLEAU IX. — *Dégradation de la glucosamine (exprimée en mg. dégradés p. 100 mg.) en fonction de la concentration en levure.*

Heures d'autolyse	Concentrations en levure		
	1	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$
1 h.	0	0	0
2 h.	71,25	0	0
4 h.	82,65	0	0
6 h.	100	11,4	0
7 h. 30	100	37,05	28,5

De l'examen de ce tableau il ressort que la suspension 1 présente une activité très nettement supérieure à sa dilution au $\frac{1}{8}$; l'affaiblissement s'accentue avec la dilution au $\frac{1}{16}$ et l'activité devient pratiquement nulle avec des dilutions plus fortes.

Nous avons voulu voir si l'action de la chaleur inhibe l'activité enzymatique : 6 g. de levure fraîche sont mis en suspension dans Q.s.p. 50 cm³ d'eau distillée. 1 cm³ de cette suspension est ajouté à 11 cm³ d'une solution de glucosamine à pH 7,3. Le reste de la suspension est porté 20 minutes au bain-marie bouillant, puis 1 cm³ est ajouté à 11 cm³ de solution de glucosamine ayant respectivement comme pH : 8, 7,3, 6,1, 5,5.

Nous donnons les résultats ci-dessous :

TABLEAU X. — *Dégradation de la glucosamine (en mg. dégradés p. 100 mg.) en solution dans une suspension de levure chauffée.*

pH	Heures d'autolyse	
	5 h.	6 h. 30
8	0,00	0
7,3	3,44	37,44
6,1	12,04	78,4
5,5	0	22,36

Nous avons constaté qu'après 5 h. la glucosamine mise en solution dans la suspension de levure non chauffée est complètement décomposée. En ce qui concerne la levure chauffée une certaine activité enzymatique persiste mais elle se manifeste plus tardivement.

c) Désamination enzymatique.

Nous avons enfin recherché si la dégradation de la glucosamine par la levure de bière se fait avec désamination. Au cours d'une expérience poursuivie dans des conditions de pH et de concentration en levure optima, nous avons dosé l'ammoniaque en utilisant la technique de Crismer, précédemment décrite. Voici nos résultats :

	Glucosamine dégradée p. 100 cm³	Azote ammoniacal dégagé en mg. p. 100 cm³	Glucosamine (en mg. p. 100) correspondant théoriquement à l'azote ammoniacal formé
	—	—	—
Après 2 h. 45 d'autolyse ...	18,5	0,95	12,1

On voit que les quantités de glucosamine désaminées sont très inférieures à celles de glucosamine dégradées, en effet 34,6 p. 100 de celles-ci ne sont pas désaminées.

Conclusion : La levure fraîche possède un système enzymatique capable de décomposer la glucosamine. Une quantité déterminée de levure mise en jeu est nécessaire pour que l'activité se manifeste rapidement. Le pH optimum d'activité est 7,4. Dans ces conditions, l'activité enzymatique est maxima entre une heure et deux heures d'autoylse.

B. — *DÉGRADATION CHIMIQUE DE LA GLUCOSAMINE EN MILIEU ALCALIN.*

Nous avons signalé plus haut, les travaux d'Herbst et de C. Dumazert et H. Lehr, relatifs à la décomposi-

tion de la glucosamine sous l'agent d'oxydants, en milieu alcalin. Nous rappelons qu'HERBST a montré que cette réaction se fait avec formation d'arabinose et d'érythrose cyanhydrine, puis ce nitrile se décompose en érythrose et HCN. C. DUMAZERT et H. LEHR, ont étudié l'oxydation de la glucosamine en milieu alcalin par l'iode, et ces auteurs ont été amenés à reconnaître que la réaction principale résidait dans la transformation de la glucosamine en nitrile (érythrose-cyanhydrine), après avoir donné de l'acide glucosaminique. Celui-ci aurait réagit comme un acide aminé et se transformerait successivement en acide dihalogéno-aminé, en acide halogéno-iminé, puis par décarboxylation, en imine halogéné et enfin en nitrile (GOLDSCHMIDT [31]).

Si l'oxydant est le facteur essentiel de cette décomposition, il semble que l'alcalinité du milieu ne soit pas indifférente à ces réactions. Nous nous sommes proposés d'étudier la dégradation de la glucosamine en milieu alcalin en l'absence d'agent oxydant.

1° ***Décomposition de la glucosamine en fonction du pH et du temps.*** — Nous avons recherché la stabilité de la glucosamine (ClH) en solution aqueuse à des pH alcalins, en milieu tampon de phosphates. Les solutions sont conservées à l'étuve à 37° pendant toute la durée de l'expérience. Nous donnons dans le tableau suivant les résultats obtenus :

TABLEAU XI. — *Pourcentage de glucosamine dégradée (exprimée en mg.) en solution aqueuse, en fonction du pH et du temps.*

pH	15 heures	24 heures
7,1	0	0
7,6	0	16
8	11,2	17,5
9	21,3	27,3
NaOH N/10	86	100

La glucosamine est donc dégradée en milieu alcalin et d'autant plus rapidement que le pH est plus élevé. A pH 7,6 déjà on observe un début de dégradation entre 15 heures et 24 heures, et la vitesse de décomposition est relativement grande lorsque l'amino-glucide est en solution dans la soude décinormale.

2° ***Etude de la décomposition de la glucosamine (ClH) en solution dans la soude N/10 par l'emploi des méthodes de dosage colorimétrique et iodométrique.*** — Nous avons ensuite suivi la dégradation de la glucosamine (ClH) en solution dans la soude décinormale, en effectuant simultanément des dosages colorimétriques de la glucosamine et des dosages iodométriques, pensant que la comparaison entre ces résultats fournirait des indications sur les réactions qui se passent au cours de la décomposition de ce sucre aminé en milieu alcalin.

Nous donnons ci-dessous la technique de dosage iodométrique adaptée à la glucosamine par C. Dumazert et H. Lehr : Dans un flacon en verre blanc bouchant à l'émeri, on introduit 5 cm³ de réactif alcalin de formule :

Phosphate disodique à 2 molécules d'eau.	17,8	g.
Solution de soude 0,1 N	350	cm³
Eau distillée Q.s.p.....	1.000	cm³

Ajouter la prise d'essai de la glucosamine ou de son chlorhydrate, comprise entre 0,20 et 1,50 mg. et enfin 2 cm³ d'une solution d'iode 0,0625 N, mesurés avec précision. Préparer un esai témoin de la même manière en remplaçant la solution de glucosamine par un égal volume d'eau. Boucher et laisser réagir à la température du laboratoire pendant 30 à 45 minutes. Au bout de ce temps acidifier l'un des essais (ne pas acidifier les deux essais en même temps) au moyen de 3 cm³ d'acide sulfurique normal, agiter, et au bout de 30 secondes, ajouter 10 cm³ d'une solution saturée de borate de soude. Effectuer le titrage de l'excès d'iode par une solution d'hyposulfite 0,005 N préparée extemporanément en présence d'un bon amidon soluble. Titrer de même l'essai témoin.

Calcul du résultat. — Si N est le nombre de cm³ d'hyposulfite 0,005 N versés à la suite du titrage de l'essai à blanc et *n* celui relatif à l'essai proprement dit, la quantité de glucosamine (M = poids moléculaire de celle-ci) contenue dans la prise d'essai est donnée par :

$$(N - n) \times \frac{M}{6} \times \frac{1}{200} = \text{mg. de glucosamine soit}$$

$$(N - n) \times 0{,}149 = \text{mg. de glucosamine.}$$

Voici les résultats obtenus au cours de notre expérience :

TABLEAU XII. — *Etude comparative des variations de la concentration d'une solution de glucosamine (ClH) dans la soude N/10, en fonction du temps, par l'emploi des méthodes de dosage colorimétrique et iodométrique.*

Temps de réaction (heures)	Glucosamine (ClH) exprimée en g. p. 100 cm³	
	Dosage colorimétrique	Iodométrique
0	1,840	1,840
0,45	1,840	1,840
2	1,840	1,840
4,30	1,720	
6,30	1,560	1,564
8	1,480	1,476
24	0,920	0,930
30	0,816	0,818
72	0	0

Les dosages effectués par les méthodes colorimétriques et iodométriques, nous donnent des résultats d'un parallélisme complet qui laisse présager des modifications profondes dans la structure de la glucosamine au cours de sa dégradation en milieu alcalin.

3° ***Désamination.*** — Nous avons recherché si la dégradation se produit avec une désamination.

Nous avons étudié la désamination de la glucosamine (ClH) en solution dans la soude N/10.

Nous avons fait parallèlement des dosages colorimétriques de la glucosamine et des dosages d'ammoniaque.

Pour ce dernier, nous avons utilisé la méthode d'Yvanovitch dont nous donnons le principe de la technique et la description de l'appareil :

Cette méthode consiste à déplacer l'ammoniac des sels ammoniacaux par le carbonate de lithium et à l'entraîner ensuite par la vapeur d'eau dans le vide obtenu par une trompe à eau, à la température de 40 à 50°. On retient enfin l'ammoniac par une solution de ClH N/70. L'appareil se compose de trois flacons coniques. Le flacon A, générateur de vapeur d'eau, est bouché par un bouchon à trois trous : l'un R le met en communication avec l'extérieur ; par un tube capillaire passent les bulles qui amorcent et entretiennent une ébullition régulière ; la vapeur sort par un tube b qui fait communiquer A avec le deuxième flacon C. Ce dernier est destiné à recevoir le liquide à analyser. Un robinet R' le met en relation avec une petite ampoule à décantation qui sert à introduire le carbonate de lithium. Un tube fait enfin communiquer C avec le troisième flacon D dans lequel on met un volume déterminé de ClH N/70. Enfin d'expérience, la titration de cet acide s'effectue au moyen d'une solution de soude N/70 en présence d'une goutte de rouge de méthyle. (1 cm^3 de cette solution de soude correspond à 0,2 mg. d'azote).

Nous avons poursuivi nos expériences de la façon suivante : une solution de glucosamine (ClH) à 1 g. p. 100 est préparée dans la soude N/10 ; une partie sert de témoin ; on prélève d'autre part le volume sur lequel doit se faire le dosage d'ammoniaque et on l'introduit dans la fiole A de l'appareil. Nous mettons celle-ci en communication avec la fiole D pour éviter les pertes d'ammoniaque au cours de l'expérience ; l'appareil est placé dans l'étuve à 37° C. ainsi que le tube témoin.

Expérience A.

a) Le dosage colorimétrique effectué sur le témoin montre une décomposition de 950 mg. de glucosamine pour 100 cm^3 de solution.

b) Le dosage d'ammoniaque (effectué sur 10 cm^3) montre qu'il s'est formé 21,9 mg. d'azote ammoniacal pour 100 cm^3 de solution.

Or, théoriquement, à 950 mg. de glucosamine ClH correspond 61,8 mg. d'azote. Donc 40 mg. d'azote ne sont pas passés sous forme d'ammoniaque ; ils correspondent à 642,6 mg. de glucosamine (ClH) ; on en déduit que pour 100 g. de glucosamine (ClH), 67,8 ne sont pas désaminés, ce qui correspond environ aux 2/3.

Expérience B.

a) Le dosage colorimétrique détermine une quantité de glucosamine décomposée de 1,680 g. pour 100 cm^3 de solution ;

b) Il s'est formé parallèlement 42,8 mg. de N ammoniacal qui correspondent à 0,642 g. de glucosamine.

Il en découle que pour 100 g. de glucosamine décomposée, 61,7 ne sont pas désaminés ; cette valeur correspond encore environ aux 2/3 de la totalité du sucre aminé mis en jeu.

En résumé, la glucosamine est lentement dégradée en milieu alcalin et le parallélisme des résultats fournis par les dosages colorimétriques de la glucosamine et iodométriques laissent présumer que cette transformation se fait avec des modifications profondes de la constitution de la glucosamine. Parmi celles-ci nous avons montré qu'il se produit une désamination partielle de ce sucre aminé.

C. — *LA GLUCOSAMINE PEUT-ELLE ÊTRE CONSIDÉRÉE COMME UTILISÉE A LA SYNTHÈSE BIOLOGIQUE DE LA VITAMINE C ?*

Nous avons signalé que Von Euler et Klussmann au cours de leur étude sur l'oxydation de la glucosamine en milieu acide, ont obtenu des corps réduisant le dichlorophénol indophénol et le permanganate en milieu acide. Ces auteurs avaient pensé à la formation de corps

voisins de l'acide ascorbique. D'autre part, on sait que la plupart des animaux font la synthèse de la vitamine C sauf un petit nombre d'entre eux parmi lesquels le cobaye. L'homme est également sensible aux carences en vitamine C.

En 1938, Meutzen mentionne l'origine endogène de cette vitamine, mais il ne lui est pas posible de démontrer qu'elle prend naissance à partir des glucides alimentaires. L'ensemble des travaux de plusieurs auteurs (Guha et Ghosh, Hawthorn, Harrisson et Kloth, Rudra) font ressortir le rôle du manganèse dans la synthèse biologique de la vitamine C. Mitalo a signalé celui des vitamines B_2. Enfin P. Rohmer et N. Bezssonoff [66] ont fait une étude très intéressante relative à la synthèse de la vitamine C chez le nourrisson humain. Ces auteurs estiment que le nourrisson a besoin de 2 mg. par kg. de poids de vitamine C par jour, puis après un an, ce besoin diminue et pour l'adulte 1 mg. suffit. Or Rohmer et Bezssonoff remarquent que les nourrissons, surtout lorsqu'ils sonts soumis à l'alimentation artificielle, ne disposent presque jamais des doses indiquées et cependant le scorbut est exceptionnel chez eux. De plus, soumis à un régime carencé en C, le nourrisson continue à éliminer cette vitamine, alors que chez l'adulte cette élimination s'arrête dès le troisième jour de carence.

Deux hypothèses peuvent être faites : la première explique le comportement du nouveau-né, par l'existence d'un dépôt de vitamine C pendant la vie intra-utérine et persistant chez le nourrisson pendant une certaine période (Hahn [32] et W. Neuwerler [55]). D'après la deuxième hypothèse, on admet que le nourrisson est capable de faire lui-même la synthèse de l'acide ascorbique.

Rohmer et Bezssonoff ont discuté la thèse d'une réserve de vitamine C et ont conclut qu'elle ne peut être retenue. « Des travaux expérimentaux et cliniques montrent que l'organisme ne met pas les vitamines hydrosolubles en réserve. Il les utilise immédiatement, ou les élimine si elles se trouvent en excès ». D'autre part, les mêmes au-

teurs ont établi plusieurs faits sur le pouvoir de synthèse de la vitamine C chez les nourrissons. Elle atteint un point culminant le 4e mois fœtal, est très active chez le nouveau-né et le pré-maturé et sera encore suffisante pendant la 1re année. Elle devient négligeable chez l'enfant plus âgé mais ces auteurs mentionnent, que d'après certaines observations, elle pourrait encore exister chez l'adulte. Dans les cas pathologiques divers (dyseptie, infections) la faculté de synthèse du nourrisson est diminuée. Mais après la guérison, le taux de l'acide ascorbique remonte à sa valeur normale malgré une alimentation pauvre ou dépourvue en vitamine C.

Nous avons tenté de chercher si *in vivo*, la glucosamine pouvait être à l'origine de substances « pro-vitamines C ».

1° ***Recherches poursuivies in vivo sur des cobayes.*** — Les expériences ont porté sur des cobayes dont on connaît la sensibilité à la carence en vitamine C ; voici le régime scorbutigène adopté :

Avoine	83 parties
Chlorure de sodium	1,5
Lactate de calcium	5
Levure de bière	3
Sciure de bois	2,5
Graisse	5,5

additionné de quelques gouttes d'huile de foie de morue.

Quatre cobayes sont soumis à ce régime pendant deux jours ; à partir de ce moment, on ajoute au régime de deux d'entre eux (lot A) du chlorhydrate de glucosamine. Le régime des 2 autres (lot B) ne contient pas de glucosamine.

Pendant 8 jours le lot A reçoit 50 mg. de glucosamine (ClH) par jour, puis cette quantité est élevée à 250 mg. Les cobayes du lot B présentent rapidement les symptômes du scorbut : excitation, suivie de torpeur, diarrhée sanguinolente, enflure des articulations.

L'un meurt après 20 jours ; au deuxième on administre de la glucosamine à l'apparition des selles hémorragi-

ques. Son état a paru s'améliorer au cours des 24 premières heures mais il meurt 3 jours après, c'est-à-dire le 24e jour d'expérience. Les cobayes du lot A ont également succombé : l'un après 24 jours, l'autre après 27 jours. Tous les cobayes ont subi des variations de poids dont voivi les chiffres extrêmes :

	poids initial	à la veille de la mort
Lot A	547 g.	393 g.
	457 g.	405 g.
lot B	525 g.	410 g.
	580 g.	400 g.

Au cours de cette expérience on a dosé l'acide ascorbique dans l'urine des animaux. On recueille les urines de 24 heures dans des récipients renfermant 10 cm³ d'acide trichloracétique à 20 p. 100. Le volume est mesuré et amené à 50 cm³ avec de l'eau distillée. On filtre et on applique la méthode de Manceau, Policard et Ferrand [50]. Après 5 jours de régime scorbutigène, l'acide ascorbique a complètement disparu de l'urine des cobayes du lot B. Chez ceux recevant de la glucosamine (ClH) on ne dose que des quantités très faibles, pratiquement nulles. Il n'y pas non plus de différences nettes dans les pouvoirs oxydo-réducteurs, très faibles d'ailleurs, des organes (foie, rein, capsules surrénales) des animaux des lots A et B.

2° ***Recherches poursuivies in vivo sur des rats.*** — Une expérience a été conduite en même temps sur 2 lots de rats, selon le même protocole. Ceux-ci font normalement la synthèse de l'acide ascorbique, mais nous avons voulu nous rendre compte si la glucosamine est susceptible de provoquer chez le rat soumis au régime scorbutigène, une surcharge en vitamine C au niveau de certains organes, foie et reins. Les rats ont été sacrifiés après 25 jours.

Dans le foie des animaux au régime scorbutigène sans addition de glucosamine (ClH), le taux de la vitamine C était normal. On a en effet trouvé 16,923 mg. pour 100 g. de tissus frais chez l'un, 15,970 mg. pour l'autre. Mais

chez les rats qui avaient reçu de la glucosamine, le taux était dans le foie beaucoup plus élevé : 25,147 mg. et 20,769 mg.

Dans les reins on a trouvé pour les deux lots des valeurs sensiblement identiques.

Lot A : 32,1 mg. p. 100 g. de tissus frais	Lot B : 30 mg.
29 mg.	32 mg.

Ainsi, de l'ensemble des résultats obtenus avec les cobayes, il ressort que ces animaux sont incapables d'utiliser la glucosamine comme substance « provitamine C » dans les conditions de nos expériences. Par contre une surcharge hépatique a été observée chez les rats qui ont reçu de la glucosamine. Ces résultats obtenus avec un lot de rats trop restreint ne nous permettent pas de tirer des conclusions absolues et il nous semble que des recherches mériteraient d'être poursuivies dans cette voie.

DEUXIÈME PARTIE.

Contribution à l'étude des glucides combinés du sang.

Dans cette partie de notre travail nous avons eu pour objet :

1° L'application de notre technique de dosage colorimétrique de la glucosamine à la détermination de cet aminohexose faisant partie des glucides protéidiques.

2° L'étude du comportement du sucre faiblement combiné chez le diabétique.

I. — DÉTERMINATION DE LA GLUCOSAMINE DANS LE SANG.

Nous avons été surpris par les faibles quantités de glucosamine déterminées dans le sérum humain par les principaux auteurs qui ont étudié ce sucre aminé et son dosage. En effet H. Bierry [6] a montré que la constitution du groupement prosthétique glucidique des protéines du plasma sanguin comprend une molécule d'acétyl-glucosamine pour deux molécules d'hexoses. Donc la glucosamine constituerait le tiers environ du sucre protéidique. Or, ce même auteur a donné pour la glucosamine des taux assez variables, dont la valeur moyenne est de 0,250 g. environ pour 1000 cm^3 de sérum. A côté de ces quantités de glucosamine l'auteur donne les valeurs correspondantes de sucre protéidique total de 2,50

g. environ. D'après ces résultats, la valeur du taux de la glucosamine ne serait que le 1/10 de celle du sucre protéidique.

Nilsson [56] a déterminé des taux plus faibles encore dont le plus élevé est de 125 mg. p. 1000 cm³. Nous remarquons qu'au cours du dosage de la glucosamine dans le plasma cet auteur, après hydrolyse par l'acide chlorhydrique normal, ne fait pas de déprotéinisation ; il centrifuge et recueille le liquide surnageant ainsi que les eaux de lavage du culot, et c'est sur ces liquides neutralisés qu'il fait un dosage colorimétrique.

Bierry [6] emploie une tout autre méthode basée sur le fait que le nitrate de mercure précipite la glucosamine, tandis que l'acide phosphotungstique ne la précipite pas. Il fait deux dosages (microbertrand) sur deux parties aliquotes de sérum, en déprotéinisant l'une par le nitrate de mercure et l'autre par l'acide phosphotungstique.

A. — *CHOIX DU DÉPROTÉINISANT.*

Nous avons cherché une nouvelle technique de dosage. Dans nos premiers essais, nous avons employé comme déprotéinisant une solution de tungstate de soude à 10 p. 100, mais au moment de l'addition du réactif d'Erlich il se formait un précipité d'acide tungstique qui adsorbait une grande partie de la coloration et donnait des résultats par défaut. Nous trouvions comme valeur moyenne chez des sujets normaux, 300 mg. de glucosamine p. 1000 cm³. Nous avons alors adopté l'acide trichloracétique dans les conditions suivantes : le sang est recueilli dans un tube fluoré. Après centrifugation on prélève 1 cm³ de sérum qu'on hydrolyse par 4 cm³ d'acide sulfurique normal au bain-marie bouillant 2 h. 30. La neutralisation est faite avec 2 cm³ de soude 2 N. On agite. On déprotéinise par 3 cm³ d'acide trichloracétique à 0,5 p. 100 et après agitation on porte au

bain-marie bouillant 15 minutes. On filtre. Le dosage porte sur 1 cm³ du filtrat qu'on additionne de 1 cm³ d'eau distillée. Ainsi le volume sur lequel s'effectue le dosage correspond à 1/10ᵉ de cm³ de sérum.

B. — *TAUX DE LA GLUCOSAMINE DANS LE SANG ET DISCUSSION DES RÉSULTATS.*

Dans le tableau suivant nous donnons les résultats des dosages effectués sur des sérums humains. A côté du taux de la glucosamine, nous donnons la valeur correspondante du sucre protéidique déterminé dans les mêmes sérums selon la technique mise au point par C. Dumazert et Penet.

TABLEAU XIII. — *Valeurs de la glucosamine et du sucre protéidique dans le plasma humain.*

Glucosamine en g. p. 1000 cm³	Sucre protéidique en g. p. 1000 cm³
0,750	2,55
0,900	3,40
0,600	2,30
0,880	2,80
0,850	3,10
0,650	2,27
0,610	2,75
1	3,60
0,950	3,37
1,050	3,78

Ces résultats sont en accord avec ceux de West, Clark et Kennedy qui indiquent que le taux normal de la glucosamine oscille entre 0,750 et 1,110 g. Ils cadrent assez sensiblement avec la proportion définie par Bierry, à savoir un tiers de glucosamine dans le sucre protéidique du sérum.

En résumé, nous proposons une technique de dosage de la glucosamine dans le sérum, qui nous a permis

d'évaluer des quantités plus conformes avec la constitution du complexe glucidique combiné aux protéines sériques, que celles données par la plupart des auteurs.

II. COMPORTEMENT DU SUCRE FAIBLEMENT COMBINÉ CHEZ LES DIABÉTIQES.

A. — *VALEUR DE LA GLYCÉMIE LIBRE, DU SUCRE FAIBLEMENT COMBINÉ ET DU RAPPORT* $\frac{\text{glycémie libre}}{\text{sucre faiblement combiné}}$, *CHEZ LES SUJETS NORMAUX ET LES DIABÉTIQUES NON TRAITÉS.*

Pour nous permettre une étude comparative, nous avons tout d'abord déterminé la valeur de la glycémie libre (G) puis celle du sucre faiblement combiné (F) et établi le rapport $G/F = \frac{\text{glycémie libre}}{\text{sucre faiblement combiné}}$ chez des sujets normaux.

Les mêmes dosages ont été faits ensuite sur des sérums de diabétiques non traités et nous avons enfin étudié l'influence du traitement insulinique sur le taux du sucre faiblement combiné au cours du diabète.

Méthode de dosage de la glycémie et du sucre faiblement combiné : Les dosages qui ont porté sur des sangs normaux et diabétiques, ont été effectués selon la technique suivante : le sang reçu sur du fluorure de sodium en poudre (2 g. FNa p. 1000 cm^3 de sang) est aussitôt centrifugé. La glycémie est dosée par la méthode Hagedorn-Jensen après déprotéinisation cadmique. Soit A sa valeur.

Pour le microdosage du sucre faiblement combiné, on applique la méthode mise au point par C. Dumazert et Penet ; on soumet 0,1 cm^3 de plasma à l'hydrolyse au moyen de 2 cm^3 de solution de sulfate de cadmium utilisée pour la déprotéinisation du sang et contenant 60,5 cm^3 de solution normale d'acide sulfurique par litre.

(En conséquence l'hydrolyse est obtenue par une solution d'acide sulfurique très diluée de 0,0605 normale). On porte au bain-marie bouillant pendant 2 heures. Après refroidissement et déprotéinisation par addition de 1 cm³ de soude, 0,275 N, on dose les glucides totaux.

TABLEAU XIV. — *Valeur de la glycémie libre, du sucre faiblement combiné et du rapport G/F chez les sujets normaux.*

Glycémie libre (G) exprimée en g. de glucose (p. 1000 cm³ de plasma)	Sucre faiblement combiné (F) exprimé en g. de glucose (p. 1000 cm³ de plasma)	G/F
1,06	0,33	3,21
0,99	0,37	2,67
1,15	0,29	3,96
1,26	0,29	4,35
1,03	0,32	2,74
1,15	0,22	5,15
0,86	0,17	5,05
0,69	0,54	1,18
1,13	0,16	7,05
0,90	0,28	3,22

TABLEAU XV. — *Valeur de la glycémie libre, du sucre faiblement combiné et du rapport G/F chez les diabétiques non traités.*

Glycémie libre (G) exprimée en g. de glucose (p. 1000 cm³ de plasma)	Sucre faiblement combiné (F) exprimé en g. de glucose (p. 1000 cm³ de plasma)	G/F
2,04	0,20	10,02
2,16	0	∞
2,14	0,19	11,2
3,31	0,05	61,1
2,97	0,17	21,9
2,36	0,30	7,85
2,51	0,10	35,10
2,0	0,16	4,45
3,86	0,12	32,10
2,85	0,13	10,2

Soit B leur valeur. La différence B-A, représente la quantité de sucre faiblement combinée, exprimée en glucose.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau XIV qui est relatif aux sujets normaux ; le tableau XV est relatif aux diabétiques non traités et le tableu XVI se rapporte aux diabétiques traités par l'insuline.

Nous voyons par ces résultats que la valeur moyenne du sucre faiblement combiné chez le sujet normal est 0,30 g. pour 1000 cm³ ; d'autre part, le rapport $\frac{G}{F} = \frac{\text{glycémie libre}}{\text{sucre faiblement combiné}}$ est dans ce cas toujours inférieur à 7,5 et sa valeur moyenne est 3,85.

Chez le diabétique le taux du sucre faiblement combiné est généralement inférieur à celui des sujets normaux ; dans un cas, cette valeur est nulle et dans deux cas elle est très voisine de zéro. Donc, à l'hyperglycémie diabétique, correspond généralement un abaissement du taux du sucre faiblement combiné.

Les valeurs les plus basses de ce taux ne correspondent pas nécessairement aux valeurs les plus élevées de la glycémie.

Quant au rapport G/F il a une valeur très supérieure à 7,5, exception faite pour un cas ; la valeur élevée de ce rapport résulte à la fois de l'hyperglycémie et de l'abaissement du sucre faiblement combiné.

B. — *CHEZ LES DIABÉTIQUES TRAITÉS PAR L'INSULINE.*

Nous avons ensuite étudié le comportement du sucre faiblement combiné chez le diabétique traité par l'insuline. Une première prise de sang est faite au malade à jeûn, le matin, avant la première injection d'insuline de la journée. Celle-ci est administrée aussitôt après. On fait par la suite, une ou plusieurs prises de sang, de deux heures à cinq heures après l'injection d'insuline.

Dans deux cas, le jeûne a été maintenu jusqu'à la fin de l'expérience mais habituellement cette condition n'a pu être observée, les malades la supportant mal. Les quantités d'insuline administrées sont celles prescrites au cours du traitement ; voici les résultats :

TABLEAU XVI. — *Valeur de la glycémie libre, du sucre faiblement combiné et du rapport G/F chez les diabétiques traités par l'insuline.*

Temps de l'expérience	Glycémie libre (G) (en g. de glucose p. 1000 cm³ de plasma	Sucre faibⁿᵗ combiné (F) (en g. de glucose p. 1000 cm³ de plasma	G/F
Avant Insuline	1,83	0,19	9,6
(jeûne maintenu jusqu'à le 2e prise de sang) 2 h. 15 après.	0,27	0,54	0,5
Avant Insuline	3,30	0,40	8,2
2 h. 45 après	3,16	0,45	7,02
3 h. 45 après	2,58	0,62	3,1
Avant Insuline	0,98	0,43	2,2
2 h. après	0,47	0,54	0,87
Avant Insuline	3,62	0,08	45,2
3 h. après	3,06	0,06	51
5 h. après	2,68	1,02	2,6
Avant Insuline	2,33	0,41	5,6
(jeûne maintenu jusqu'à la 2e prise de sang) 2 h. 15 après	0,37	0,15	3,4
Avant Insuline	2,26	0,42	5,3
2 h. 30 après	1,49	0,26	5,7
Avant Insuline	3,36	0,20	16,8
5 h. après	2,78	0,54	5,1
Avant Insuline	1,17	0,59	1,9
2 h. après	1,07	0,51	2,09
3 h. 15 après	0,78	0,14	5,5
Avant Insuline	4,12	0,16	25,7
3 h. après	3,56	0,12	29,6
Avant Insuline	2,32	0,86	2,7
2 h. après	0,47	0,37	1,2

On constate que dans le diabète le sucre faiblement combiné est sensible à l'action de l'insuline. Généralement on note une augmentation du sucre faiblement combiné, parallèlement à un abaissement de la glycémie.

Cependant dans quatre cas, le sucre faiblement combiné diminue en même temps que la glycémie. Mais alors on observe que le rapport G/F (*) initial était déjà inférieur à 7,5, tandis que généralement, lorsqu'il y a une élévation de sucre faiblement combiné, le rapport G/F (*) initial est supérieur à 7,5. De plus, deux de ces cas présentent un caractère particulier (Expériences 5 et 8). En effet, après l'administration de l'insuline, la glycémie était descendue bien au-dessous du taux normal, et un des malades (5) avait manifesté des accidents hypoglycémiques au cours de l'expérience. Mais l'observation de tels réslutats doit provenir surtout du fait que l'action de l'insuline sur la glycémie et le sucre faiblement combiné se manifeste plus ou moins rapidement suivant les malades. Or, dans les expériences sur le diabète humain, il n'est pas possible de faire des prises de sang très nombreuses ni très rapprochées. Il y a donc de fortes chances pour que, dans le cas où une augmentation du sucre faiblement combiné n'ait pas été notée, celle-ci soit passée inaperçue, la deuxième prise de sang, après l'insuline, ayant été faite trop tôt ou trop tard. D'ailleurs C. Dumazert et Memmi ont noté des variations de ce genre au cours de leurs études expérimentales relatives à l'action de l'insuline sur le sucre faiblement combiné, *in vivo*. Pendant l'heure qui s'écoule après l'injection de l'insuline au Chien, ces auteurs ont vu, tout d'abord, un léger abaissement du sucre faiblement combiné concomitant à celui de la glycémie. Puis, le sucre faiblement combiné augmente rapidement alors que la glycémie continue à baisser. Mais après un temps variable, suivant les animaux, le sucre faiblement combiné diminue de nouveau et en fin d'expérience il est souvent inférieur au taux initial. Ces résultats et ceux que nous avons obtenus au cours du diabète, concourent à

préciser que le rôle du sucre faiblement combiné (C. Dumazert) peut être assimilé à celui d'une réserve immédiatement utilisable, comme le supposait Lépine au sujet du « sucre virtuel ».

En résumé nous avons observé un abaissement très net du taux du sucre faiblement combiné chez la plupart des diabétiques. Cette fraction peut même devenir indosable.

Sous l'action du traitement par l'insuline, ce taux s'élève pendant que celui de la glycémie diminue.

D'autre part nous avons déterminé les valeurs du rapport $\frac{\text{glycémie libre}}{\text{sucre faiblement combiné}}$; il est inférieur à 7,5 chez le sujet normal et il est très supérieur à ce chiffre dans les cas de diabète. Mais après administration de l'insuline aux malades, ce rapport diminue. Les valeurs de celui-ci sont la conséquence directe des variations inverses du sucre faiblement combiné et de la glycémie.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Les recherches que nous avons poursuivies ont abouti à des résultats divers qu'il convient maintenant de résumer. Certaines de nos conclusions se rapportent à la biochimie de la glucosamine, d'autres aux glucides combinés du sang.

I. — Sur la Biochimie de la glucosamine.

A. — Dosage colorimétrique.

M. Sörensen a montré l'influence du pH au cours de la condensation de l'acétyl-acétone avec la glucosamine et elle a déterminé que le pH optimum de cette réaction est 9,5. Après avoir examiné cette étude nous avons apporté les modifications suivantes au dosage colorimétrique. Nous avons pensé utiliser une solution tampon alcaline de phosphates qui maintient le pH constant pendant la durée de la condensation. Nous avons ensuite déterminé les conditions les plus favorables à la condensation en fonction des quantités d'acétyl-acétone mises en jeu, de la durée du chauffage à 100° C de ce réactif avec la glucosamine, ainsi que le temps nécessaire au développement maximum de la coloration après addition du réactif d'Ehrlich.

Nous proposons une technique de dosage dont la sensibilité est voisine de celle obtenue par la méthode de M. Sorensen. Mais elle a l'avantage d'offrir une fidélité beaucoup plus satisfaisante que les techniques antérieures.

B. — Dégradation biologique de la glucosamine.

a) *Par les tissus.*

Nous avons mis en évidence dans les tissus musculaires un système enzymatique capable de décomposer la glucosamine et qui présente des caractères particuliers. Dans ces tissus, l'activité de l'enzyme ne se manifeste en effet qu'après 14 heures d'autolyse. A partir de ce moment on observe une activité enzymatique maxima pendant 1 heure. Puis celle-ci s'affaiblit. La quantité de glucosamine dégradée dans l'unité de temps diminue dans de fortes proportions, lorsqu'on met en œuvre des purées musculaires ayant subi des autolyses prolongées au delà de 16 à 20 heures.

Nous avons déterminé que le pH optimum d'activité est 7,4.

Nous avons ensuite recherché si cette dégradation se fait avec désamination, et dans ce but, nous avons dosé l'ammoniaque au cours de la période d'activité enzymatique. Nous avons alors constaté que la désamination est complète. En effet la quantité d'ammoniaque apparu correspond à celle de la glucosamine ayant disparu.

Nous avons signalé un système enzymatique semblable dans le foie mais il présente une activité plus faible que celui du muscle.

La décomposition enzymatique étudiée par M^me^ Lutwack Mann sur des tissus divers a permis à cet auteur de montrer une activité nette avec les coupes de parties corticales du rein et du cerveau ainsi qu'avec les testicules. Elle a remarqué une moindre activité avec la rétine, les ovaires et les poumons. Par contre, elle a noté des résultats négatifs avec certains tissus parmi lesquels les muscles et le foie. Ces résultats s'expliquent du fait que l'activité enzymatique du muscle et du foie apparaît seulement après une période assez longue d'autolyse, ainsi que nous l'avons montré.

De l'ensemble de ces recherches, il ressort que la plupart des tissus sont aptes à faire la dégradation de la glucosamine. Cependant il n'est pas encore possible de préciser la nature des produits qui dérivent de cette décomposition, ceux-ci étant vraisemblablement dégradés à leur tour, au fur et à mesure de leur formation.

b) *Par les levures.*

La levure fraîche des boulangers possède également un système enzymatique du même type, mais son activité se manifeste après une heure seulement d'autolyse, dans des conditions de concentration en levure que nous avons précisé et, avec un maximum d'intensité, à pH 7,4. Il faut noter que la dégradation de la glucosamine par la levure se fait avec désamination partielle. En effet, comme M^me^ Lutwack Mann nous avons observé que les quantités d'ammoniaque produites dans ce cas sont inférieures à celle dont on pourrait prévoir la formation, d'après les quantités de glucosamine disparues. Nous avons observé qu'il ne prend naissance que de 65 p. 100 des quantités théoriques d'ammoniaque.

C. — Dégradation chimique.

D'après Herbst l'oxydation de la glucosamine par la chloramine T en milieu alcalin se produit avec formation d'arabinose et de nitrile (cyanhydrine de l'érythrose) en proportion variant avec les quantités d'oxydants mis en jeu. D'autre part, C. Dumazert et H. Lehr étudiant l'oxydation de la glucosamine par l'iode en milieu alcalin concluent essentiellement à la formation d'un nitrile. Nous avons pensé, qu'indépendamment de l'action propre de l'oxydant, l'alcalinité du milieu devait participer à la réaction de la décomposition de la glucosamine.

Nous avons donc cherché à préciser le mode de dégradation de cet amino-hexose en milieu alcalin en

l'absence d'agent oxydant et déterminer s'il s'agit d'une désamination. Nous avons observé les faits suivants :

La glucosamine est dégradée en milieu alcalin et d'autant plus rapidement que le pH est plus élevé. Nous avons suivi cette dégradation en faisant simultanément des dosages colorimétriques et iodométriques de la glucosamine. Le parallélisme des résultats, montre que les fonctions aminés et aldéhydes sont attaquées. De plus des dosages d'ammoniaque nous ont permis de constater qu'un tiers de la glucosamine (ClH) subit la désamination.

D. — La glucosamine peut-elle être a l'origine de la synthèse de la vitamine C *in vivo* ?

Von Euler et Klussmann ont observé que la glucosamine, oxydée en milieu acide donne naissance à des corps réduisant le dichlorophénol-indophénol. Ces auteurs considèrent que les produits résultant de l'oxydation de la glucosamine ont une structure très proche de celle de la vitamine C. Ceci étant, nous avons pensé qu'il serait intéressant de chercher si cet amino-hexose était susceptible d'être utilisé à la synthèse biologique de l'acide ascorbique. Des expériences poursuivies sur des cobayes ont permis de montrer que ces animaux sont incapables de faire la synthèse de substances comparables à la vitamine C à partir de la glucosamine.

Des recherches de même nature ont été poursuivies sur des rats, animaux insensibles à la carence de la vitamine C. Chez des rats soumis à un régime scorbutigène additionné de glucosamine (ClH), nous avons noté une surcharge hépatique en produits oxydo-réducteurs. Tels sont les résultats de nos recherches relatives à la biochimie de la glucosamine.

Les données actuelles acquises sur ce sucre aminé ne constituent qu'une introduction aux recherches qui mettront en lumière l'importance du rôle biologique de cet

hexose. En effet, par la diversité de sa répartition dans l'organisme, par sa constitution à la fois glucidique et aminée, la glucosamine présente un intérêt biologique tout particulier et nous souhaitons que ce travail contribue à attirer l'attention des chercheurs sur cette question.

II. — Sur les glucides combinés du sang.

Voici maintenant les résultats de nos recherches relatives aux glucides combinés du sang.

A. — Dosage de la glucosamine dans le plasma.

Nous nous sommes proposés d'appliquer notre technique de dosage de la glucosamine à celui de cet amino-hexose dans le sérum sanguin, où il est un des constituants du sucre protéidique.

Le sérum sanguin est tout d'abord soumis à une hydrolyse acide, puis après neutralisation, il nous a paru convenable de déprotéiniser l'hydrolysat. A cet effet nous avons porté notre choix sur l'acide trichloracétique. Ce dernier ne retient pas la glucosamine alors que d'autres déprotéinisants tels que le nitrate de mercure fixe totalement l'amino-hexose et que l'hydrate de cadmium en absorbe une fraction importante. Nous attirons l'attention sur la nécessité de cette déprotéinisation et nous attribuons les faibles valeurs trouvées par Nilson, au fait que cet auteur néglige cette opération. Le dosage colorimétrique se poursuit sur une partie aliquote du filtrat de déprotéinisaiton, selon le mode opératoire que nous avons mis au point.

Les dosages que nous avons effectués sur différents plasmas nous ont permis de déterminer des quantités de glucosamine dont les valeurs extrêmes sont : 0,600 g. et 1 g. pour 1000 cm^3 de sérum, correspondant à des taux de sucre protéidique oscillant entre 2,20 g. et 3,80 g.

Or le sucre protéidique est principalement constitué par un triholoside dont la structure est la suivante : galacto-acétyl-glucosamino-mannose (H. Bierry). Le sucre aminé représente donc un tiers environ du groupement prosthétique glucidique. Ainsi nos résultats, en accord avec ceux de West, Clark et Kennedy, nous paraissent plus conformes avec les données établies sur la constitution de la copule glucidique fortement combinée aux protéines sériques, que ceux notés par la plupart des auteurs. Ils ont en effet trouvé des taux de glucosamine très variables mais toujours inférieurs aux nôtres.

B. — Comportement du sucre faiblement combiné chez les diabétiques traités par l'insuline et chez les diabétiques non traités.

Nous avons poursuivi des recherches sur la fraction glucidique faiblement combiné aux protéines et étudiées par C. Dumazert.

Nous avons déterminé le comportement de ce sucre chez le diabétique traité par l'insuline et non traité. Ces recherches nous ont été inspirées à la suite des travaux de C. Dumazert et Memmi qui ont montré les variations de la fraction glucidique faiblement combiné *in vivo* sous l'action de l'adrénaline et de l'insuline.

Voyons tout d'abord le cas des diabétiques non traités par l'insuline. Nous avons observé que le taux de sucre faiblement combiné s'abaisse dans le diabète hyperglycémique et peut même devenir nul. Il en découle une élévation du rapport $\frac{\text{glycémie libre}}{\text{sucre faiblement combiné}}$ qui devient très supérieur à 7,5, valeur maxima chez les sujets normaux, comme nous l'avons montré par de nombreux essais.

D'autre part, sous l'action du traitement par l'insuline, le sucre faiblement combiné et la glycémie varient simultanément mais en sens inverse l'un de l'autre. Après un temps variable suivant le sujet, on note une

élévation du sucre faiblement combiné tandis que la glycémie libre s'abaisse. Le taux du sucre faiblement combiné s'élève parfois nettement au-dessus de valeurs déterminées chez les sujets normaux. Quant au rapport $\frac{\text{glycémie libre}}{\text{sucre faiblement combiné}}$ il reprend une valeur inférieure à 7,5 après administration d'insuline.

Ces résultats contribuent à mettre en évidence le rôle de la fraction glucidique faiblement combiné dans l'organisme. Celle-ci représente vraisemblablement ce que LÉPINE a appelé « le sucre virtuel ». Nos recherches apportent, après celles de DUMAZERT et MEMMI, une confirmation du rôle biologique que LÉPINE attribuait à cette fraction glucidique. En effet les conclusions de LÉPINE sont les suivantes :

« Sucre virtuel veut dire sucre existant en puissance, ayant le pouvoir de servir immédiatement aux besoins de l'organisme. »

On peut penser que le diabétique est devenu plus ou moins inapte à métaboliser ce sucre virtuel et que l'insuline, entre autres actions, lui redonne cette faculté. Des recherches poursuivies systématiquement chez les diabétiques permettraient peut-être de déterminer une relation entre l'importance de la diminution du taux du sucre faiblement combiné et la gravité de l'affection.

Vu et approuvé,
Marseille, le 23 mai 1943.
JEAN ROCHE

Vu et approuvé,
25 mai 1943.
L'Assesseur,
MERCIER.

Vu et permis d'imprimer
Aix, le 7 juin 1943.
Le Recteur,
PIERRE MARTINO.

BIBLIOGRAPHIE

1. Baudoin (A.). — *Etude sur quelques glycémies expérimentales.* Thèse de Doctorat en Médecine. Faculté de Paris, 1908.
2. Bernard (C.). — *Archives générales de Médecine,* 1938, **18**, 303.
3. Bierry (H.). — Sucre protéide du plasma sanguin. *C. R. A. des Sciences,* 1914, **158**, 278.
4. Bierry (H.). — Sur le dosage et la constitution du sucre protéidique du sang. *Bull. Soc. Chim. biol.,* 1941, **23**, 1974.
5. Bierry (H.). — Recherches sur les Euglobulines du sérum. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1942, **23**, 1125.
6. Bierry (H.) et Rathery (F.). — Introduction à la physiologie des sucres, 1935, *1 vol. Baillière et fils éditeurs,* Paris.
7. Bigwood (E. J.) et Vuillot (A.). — Du sucre sanguin dénommé protéidique dans le plasma sanguin. *C. R. Soc. Biol.,* 1928, **10**, 186.
8. Boyer et Furth. — Uzuerchunger zur Characteristick der Glücoproteide über die Bestimmung des Glucosamine. *Bio. Zeits.,* 1935, **282**, 242.
3. Bierry (H.). — Sucre protéidique du plasma sanguin. *C.* [**49**].
10. Conway (T.) et Byrne (A.). — The microdetermination of ammoniac. *Biochem. Journ.,* 1933, **27**, 419.
11. Crismer (R.). — Dosage photométrique de l'ammoniaque au moyen d'un réactif nouveau. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1937, **19**, 1000.
12. Cutler et Peat. — *J. Chem. Soc.,* 1939, 782.
12 *bis.* Dische (Z.). — *Bioc. Zeits.,* 1926, **175**, 371.
13. Dumazert (C.). — I. Recherches sur le dosage de la glycémie. Déprotéinisation par l'hydrate de cadmium et glycémie. II. Microdosage iodométrique de la glycémie. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1935, **17**, 1163-1177.
14. Dumazert (C.) et Lehr (H.). — Sur le mécanisme de l'oxydation de la glucosamine par les halogènes en milieu alcalin. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1942, **24**, 1047.
15. Dumazert (C.) et Lehr (H.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1942, **24**, 1045-1047.
16. Dumazert (C.) et Penet (G.). — Sur la nature des glucides combinés du sang. *C. R. Soc. Biol.,* 1938, **130**, 558.

17. Dumazert (C.) et Penet (G.). — Contribution à l'étude du sucre sanguin. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **28**, 913.
18. Dumazert (C.) et Penet (G.). — Sur la nature du sucre libre du sang. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, **20**, 1211-1222.
19. Dumazert (C.) et Penet (G.). — Glucides combinés du sang et glycolyse. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, 558.
20. Ege (R.) et Roche (J.). — Sur le taux des substances réductrices non fermentescibles et non glycolysables dans le sang humain. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **101**, 93.
21. Elson and Morgan. — Colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1824.
22. von Euler (H.) et Klussmann (E.). — *Ark. Kemi. Min. Geol. Ser.*, 1933, **11**, N° 8, in *Chem. Centralbl.*, 1933, **1**, 3328-29.
23. Evans (H. M.), Fraenkel Conrat (H.), Simpson (M. B.) and Li (C. H.). — Characterisation of gonadotropic hormone of the hypophysis by their sugar and glucosamine content. *Science 89* (2307), 249, **250**, 1939.
24. Figuier. — *Gazette hebdomadaire de Médecine et de Chirurgie*, 1855, 763.
25. Fischer (E.). — *Ber. d. d. Chem. Ges.*, 1888, **21**, 884.
26. Folin et Svedberg. — *J. Biochem. Chem.*, 1926, **70**, 405.
27. Fontes et Thivolle (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, **10**, 261 ; 1930, **12**, 264.
28. Frankel (S.). — *Monatshefte f. Chem.*, **19**, 819.
29. Frankel (S.) et Jellinek. — *Biochem. Zeits.*, 1927, 185.
30. Funk (C.). — *Zeits f. Physiol. Chem.*, 1914, **89**, 378. Cité d'après [**6**].
31. Goldschmidt (St.), Wiberg (E.), Nagel (F.) et Martin (K). — *Ann. Liebig*, 1927,**456**, 1-38. Cité d'après [**14**].
32. Hahn. — Zscrh. Kinderheilk, 1935, **57**, 442. Cité d'après [**66**].
33. Hanriot. — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **50**, 543.
34. Hedon. — *C. R. Soc. Biol*, 1898, **50**, 510.
35. Herbst (R. M.). — *Jour. of Biol. Chem.*, 1937, **119**, 85-91.
36. Hewitt (J. A.). — Separation of serum albumine into two fractions. *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, 2229-2236.
37. Hewitt (J. A.). — Preparation and proprieties of a globulin present in the albumin fraction of serum. *Biochem. Journ.*, 1938, **32**, 26-30.
38. Hewitt (J. A.). — The polysaccharide content and reducing power of proteins and their digest products. *Bioch. J.*, 1938, **32**, 1554-1560.
39. Hewitt et Pryde (J.). — The metabolism of carbohydrate. I. Stereo chimical changes undergene by equilibrated solutions of reducing sugars in the alimentary canal and peritoneal cavity. *Biochem. Journ.*, 1920, **14**, 395.

40. Hynd (A.) et Mac Farlane (M. G.). — *Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 1264-1272.
41. Irvine (J. C.) et Hynd (A.). — *J. Chem. Soc.*, 1912, **101**, 1128-1146.
42. Langheld (K.). — *Ber. d. D. Chem. Ges.*, 1909, **42**, 392.
43. Lehmann. — *Gazette hebdomadaire de Médecine et Chirurgie*, 1855, 763.
44. Lépine (R.). — Le sucre du sang. Un vol., 1921. Librairie Alcan, Paris.
45. Lépine (R.) et Boulud. — A propos du sucre du sang. *C. R. Ac. Sciences*, 133, 138.
46. Levene (P. A.) et Mori (T.). — The carbohydrate group of ovomucoïd. *J. Biol. Chem.*, 1929, **84**, 49.
47. Levene (P. A.) et Rothen. — On the molecular size the carbohydrates obtained from egg's protein. *J. Biol. Chem.*, 1929, **84**, 63.
48. Lobry de Bruyn (C. A.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1898, **31**, 2476, 247.
49. Lutwack Mann (C.). — Enzymic decomposition of amino sugar. *Bioch. Journ.*, 1941, **35**, 610-626.
50. Manceau, Policard et Ferrand. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, 18.
51. Miura. — *Zeits. f. Biol.*, 1895, **14**, 279.
52. Morner. — *Centralblatt f. Physiol.*, 1893, 581.
53. Mitzimana Imaizumi. — On the enzymatic decomposition of glucosaminic acid. *J. of. Biochem.*, 1937, **26**, 196.
54. Myrbaeck (K.). — *Svensk. Kem. Tid.*, 1940, **52**, 217, 30, in *Chem. Abstract.* 1940, **32**, 4058.
55. Neuweiler. — *Klin Wschr.*, 1935, 1940 ; *Z. vitaminitif.*, 1938, **7**, 311. Cité d'après [**66**].
56. Nilsson (I.). — Zur Bestimmung von Glucosamine in Proteinstoffen. *Biochem. Zeits.*, 1936, **285**, 386.
57. Pauly et Ludwig. — *Zeitscher. f. physiol. Chem.*, 1922, **121**, 176.
58. Palmer et Mayer. — *J. of Biol. Chem.*, 1934, **107**, 629.
59. Pavy. — Physiology of the carbohydrates. Londres 1894.
60. Pavy et Siau. — *Journ. of Physiol.*, 1901, **26**, 287.
61. Pichard. — *Physiol. Chem.*, 1892, **17**, 217.
61 *bis* Pringsheim (H.) et Rusehmann (G.). — *Ber. d. D. Chem. Ges.*, 1915, **48**, 680-682. Cité d'après [**14**].
62. Rimington (C.). — The chimistry of the proteins and amino acids. *An. review of Bioch.*, 1936, **5**, 117-158.
63. Roche (J.). — Recherches sur le phosphore acido soluble du sang. Sur la participation de corps phosphorés au pouvoir réducteur du sang. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 636-655.
64. Roche (J.) et Roche (A.). — Recherches sur la participation d'une combinaison phosphorée à la glycolyse du sang *in vitro*. *Soc. Chimie Biol.*, Séance du 19 mars 1929.

65. Roche (J.) et Dumazert (C.). — Sur les glucides de l'hémolymphe de Cancer Pagurus. Nature et rôle physiologique. *An. Inst. Océano,* 1939, **20**, f. 3, 87-95.
66. Rohmer (P.) et Bezssonoff (N.). — La synthèse de la vitamine chez le nourrisson humain. *Zeits. fü. Vitamin.* Tome **12**, C. ½, 106, 1942.
67. Santenoise (D.), Valette, Stankoff. — Action de la vagotonine sur l'insulino-sécrétion. *C. R. Soc. Biol.,* 1942, **136**, 788.
68. Sörensen (M.). — *C. R. Laboratoire de Carlsberg.* Série Chimique, 1938, **22**, 487.
69. Sörensen et Haugaard. — *Biochem. Zeit.,* 1933, **260**, 247.
70. Tadokoro et Kenzo. — Formation of ascorbic acid from mannose in plants and animals. *J. Agr. Chem. Soc. Japan,* 1938, **14**, 1075-9.
71. Thomas (J.). — Contribution à l'étude du pouvoir rotatoire du sucre sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1931, **13**, 377-394.
72. Velluz (L.). — Chimie et immunité. VI[e] Congrès de Chimie Biologique 1937, *1 vol. Declume éditeur,* Lons-le-Saunier.
73. West, Clark et Kennedy. — The concentration in glucosamine in normal and pathological serums. *J. Clin. Investigation,* 1938, **17**, 173. Cité d'après Chem. Abstract.
74. Winter (L. B.). — The nature of the blood sugar. *Biochem. Journ.,* 1930, **24**, 851.
75. Willstätter (R.) et Rhodewald (M.). — *Ztschr. für physiol. Chem.,* 1937, **247**, 269-280.
76. Zuckerkandl et Messiner-Klebermass. — *Diese Zeitschr.,* 1931, **236**, 19.

M. Declume, imprimeur, Lons-le-Saunier (31.2160). 549.43.200